

PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Danyelle Andrade Mota
Clécio Danilo Dias da Silva
(Organizadores)

Atena
Editora
Ano 2022



PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Danyelle Andrade Mota
Clécio Danilo Dias da Silva
(Organizadores)

Atena
Editora
Ano 2022

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Camila Alves de Cremo
Daphynny Pamplona
Gabriel Motomu Teshima
Luiza Alves Batista
Natália Sandrini de Azevedo
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

Produção científica em ciências biológicas

Diagramação:	Daphynny Pamplona
Correção:	Maiara Ferreira
Indexação:	Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão:	Os autores
Organizadores:	Danyelle Andrade Mota
	Clécio Danilo Dias da Silva

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P964 Produção científica em ciências biológicas / Organizadores Danyelle Andrade Mota, Clécio Danilo Dias da Silva. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-0021-9
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.219223003

1. Ciências biológicas. I. Mota, Danyelle Andrade (Organizadora). II. Silva, Clécio Danilo Dias da (Organizador). III. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

Ano 2022

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

As Ciências Biológicas, assim como as diversas áreas da Ciência, passam por constantes transformações, as quais são determinantes para o seu avanço científico. A produção científica tem papel essencial na avaliação da ciência, pois sustenta a avaliação qualitativa e quantitativa. A avaliação da produção científica permite inferir sobre os movimentos de institucionalização e desenvolvimento da pesquisa em campos científicos, períodos e contextos específicos. Além de permitir o entendimento dos processos de produção, difusão e uso do conhecimento, também pode orientar o desenvolvimento e a adaptação de políticas científicas, tecnológicas e de inovação.

Nessa perspectiva, o e-book "Produção Científica em Ciências Biológicas", é uma obra composta de uma série de investigações e contribuições nas diversas áreas de conhecimento que interagem nas Ciências Biológicas, com uma leitura rápida, dinâmica e cheia de possibilidades de aprendizado. Assim, o e-book é para todos os profissionais pertencentes às Ciências Biológicas e suas áreas afins, especialmente, aqueles com atuação no ambiente acadêmico e/ou profissional.

Portanto, o resultado dessa experiência, que se traduz neste e-book, objetiva apresentar ao leitor a diversidade de temáticas inerentes as áreas da Saúde, Meio Ambiente, Biodiversidade, Biotecnologia e Educação, como pilares estruturantes das Ciências Biológicas. Por fim, desejamos que a obra contribua para o enriquecimento da formação universitária e da atuação profissional, com uma visão multidimensional com o enriquecimento de novas atitudes e práticas multiprofissionais nas Ciências Biológicas.

Agradecemos aos autores pelas contribuições que tornaram essa edição possível, e juntos, convidamos os leitores para desfrutarem as publicações.

Danyelle Andrade Mota
Clécio Danilo Dias da Silva

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PLANTAS E DERIVADOS SOBRE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DE ORIGEM ALIMENTAR: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Data de aceite: 01/02/2022

Dayane de Melo Barros
Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Marcelino Alberto Diniz
Bacharel em Farmácia – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Zenaide Severina do Monte
Doutora em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

Danielle Feijó de Moura
Doutora em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Tamiris Alves Rocha
Doutora em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Marllyn Marques da Silva
Doutora em Biotecnologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

Talismania da Silva Lira Barbosa
Estudante de Graduação em Biomedicina – Instituição: Associação Caruaruense de Ensino Superior – Pernambuco

Clêidiane Clemente de Melo
Estudante de Graduação em Biomedicina – Instituição: Associação Caruaruense de Ensino Superior – Pernambuco

Taciane Paulina da Silva
Bacharel em Farmácia – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Diego Ricardo da Silva Leite
Mestre em Engenharia Biomédica – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Tâmara Thaiane Almeida Siqueira
Estudante de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde - Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

André Severino da Silva
Doutor em Biotecnologia – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Cleiton Cavalcanti dos Santos
Estudante de Graduação em Enfermagem – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Andreza Roberta de França Leite
Bacharel em Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Hélen Maria Lima da Silva
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

Silvio Assis de Oliveira Ferreira
Mestre em Bioquímica e Fisiologia – Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

Fábio Henrique Portella Corrêa de Oliveira
Doutor em Botânica – Universidade Federal Rural de Pernambuco – Pernambuco

Juliane Suelen Silva dos Santos
Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

RESUMO: A indústria está cada vez mais valorizando alternativas naturais para a conservação de alimentos, devido às exigências do mercado consumidor por opções seguras e de qualidade. Diante disso, o objetivo do estudo foi identificar evidências disponíveis na literatura acerca da atividade antibacteriana de plantas e seus derivados sobre microrganismos patogênicos de origem alimentar. Para tanto, foi realizada uma revisão integrativa de literatura com os seguintes critérios de inclusão: artigos científicos completos em português e publicados nos períodos de 2016 a 2020. Com base nos dados obtidos foram avaliados 10 artigos na íntegra e apenas um versou sobre a questão do estudo, o qual evidenciou a atividade antimicrobiana de algumas espécies vegetais frente a bactérias patogênicas. Contudo, é necessário o desenvolvimento de um maior número de estudos para determinar as condições mais apropriadas de aplicação das plantas e derivados na indústria alimentícia.
Palavras-chave: Alternativas naturais. Conservação de alimentos. Indústria alimentícia. Mercado consumidor. Qualidade.

ABSTRACT: The industry is increasingly valuing natural alternatives for food preservation, due to the demands of the consumer market for safe and quality options. Therefore, the objective of the study was to identify evidence available in the literature about the antibacterial activity of plants and their derivatives on pathogenic microorganisms of food origin. Therefore, an integrative literature review was carried out with the following inclusion criteria: full scientific articles in portuguese and published between 2016 and 2020. Based on the data obtained, 10 articles were evaluated in full and only one dealt with the question of the study, which showed the antimicrobial activity of some plant species against pathogenic bacteria. However, it is necessary to develop a greater number of studies to determine the most appropriate conditions for the application of plants and derivatives in the food industry.
KEYWORDS: Natural alternatives. Food preservation. Food industry. Consumer market. Quality.

1 I INTRODUÇÃO

As bactérias patogênicas representam não apenas um problema para a indústria alimentícia, mas também para a saúde pública, pois, podem causar Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) ou intoxicações. Nos últimos anos, os consumidores têm buscado cada vez mais por informações sobre alimentação saudável e segura, e isso tem gerado um interesse por alimentos mais naturais e sem adição de conservantes químicos sintéticos. Sabendo-se da tendência do mercado consumidor por opções mais saudáveis, vários

estudos têm sido desenvolvidos com aditivos químicos naturais para assegurar a qualidade e aumentar a vida útil dos alimentos (CDC, 2017; THIELMANN; KOHNEN; HAUSER, 2017; BAŞYIĞIT, et al., 2020).

As plantas e seus derivados têm sido referenciados como uma ótima alternativa aos conservantes sintéticos devido a eficiente atividade antimicrobiana principalmente frente a bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos. Esses compostos, também exercem efeito na melhora da estabilidade oxidativa, contribuindo consequentemente para o aumento da vida útil de vários tipos de alimentos (MACHADO; BORGES; BRUNO 2011; FERREIRA et al., 2020).

A propriedade antibacteriana dos produtos obtidos das plantas é comumente desenvolvida juntamente com a capacidade antioxidante devido a presença de fitoconstituintes (derivados de ácido fenólico, como, flavonoides, cumarinas, terpenoides e lignanas) que otimizam os benefícios promovidos pelas espécies vegetais. O efeito da combinação dos potenciais antioxidantes e antimicrobianos em uma molécula a torna ainda mais eficaz para a conservação de alimentos (PISOSCHI et al., 2016).

Várias pesquisas têm avaliado a utilização de antimicrobianos oriundos de plantas e seus derivados como conservantes naturais, e evidenciaram um efetivo potencial para utilização na indústria de alimentos (ZHENG, 2014; SULTANBAWA, 2014; DANNENBERG et al., 2016; NASTASI et al., 2022). Diante disso, o objetivo do estudo foi identificar evidências disponíveis na literatura acerca da atividade antibacteriana de plantas e seus derivados sobre microrganismos patogênicos de origem alimentar.

2 I METODOLOGIA

A revisão integrativa de literatura foi escolhida, uma vez que, esta modalidade permite reunir, avaliar e sintetizar o conhecimento produzido, decorrente de diversas abordagens metodológicas, não havendo a necessidade de qualquer análise estatística. Ao final da revisão foi possível observar o conhecimento atualizado do tema abordado e a identificação de lacunas que remetem ao desenvolvimento futuro de novos estudos. Com base na literatura, para a elaboração de uma revisão integrativa, o revisor deve estar atento a características relevantes sobre a abordagem do tema e etapas a serem seguidas, conforme abaixo apresentadas.

3 I IDENTIFICAÇÃO DO TEMA E ELABORAÇÃO DA PERGUNTA DE PESQUISA

Para a formulação da pergunta de pesquisa, bem como para a definição dos descritores aplicados na busca dos artigos científicos utilizou-se a estratégia de PICO. O uso dessa estratégia para formular a questão de pesquisa na condução de métodos de revisão possibilita a identificação de palavras-chave, as quais auxiliam na localização

de estudos primários relevantes nas bases de dados. Dessa forma, a questão delimitada para o estudo foi: “Quais plantas e derivados apresentam atividade antibacteriana frente a microrganismos patogênicos de origem alimentar”?.

4 I ESTRATÉGIA DE BUSCA NA LITERATURA E AMOSTRAGEM

Após a definição da pergunta, foram estabelecidas estratégias de busca na literatura e selecionadas na base de dados Periódicos CAPES. Foram utilizados os descritores: atividade antimicrobiana, plantas, bactérias patogênicas, alimentos e conservantes naturais (Tabela 1) e o operador booleano (operadores lógicos) “AND”. Os critérios de inclusão foram: artigos científicos completos em português, publicados nos períodos de 2016 a 2020. Foram excluídas as publicações que não se enquadravam no nível de critérios estabelecidos e que não atendessem ao objetivo do estudo.

Base de dados	Descritores em português
Periódicos CAPES	Atividade antimicrobiana Plantas Bactérias patogênicas Alimentos Conservantes naturais

Tabela 1. Base de dados e descritores utilizados para a pesquisa.

5 I DEFINIÇÃO DAS INFORMAÇÕES QUE FORAM EXTRAÍDAS DOS ESTUDOS SELECIONADOS

Foram utilizados instrumentos consolidados com o propósito de reunir, organizar e sumarizar as informações de modo conciso, construindo bancos de dados de fácil acesso e manejo.

6 I AVALIAÇÃO DOS ESTUDOS PRIMÁRIOS INCLUÍDOS NA REVISÃO

Os dados obtidos em cada publicação foram analisados de acordo com o objetivo da pesquisa.

7 I ANÁLISE E SÍNTESE DOS RESULTADOS DA REVISÃO INTEGRATIVA

De forma imparcial, os resultados das publicações selecionadas nas bases de dados foram confrontados.

8 | APRESENTAÇÃO DA REVISÃO INTEGRATIVA

Os principais resultados evidenciados da análise das publicações selecionadas são apresentados adiante.

9 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a localização dos artigos no portal Periódicos CAPES, obteve-se um total de 87 artigos localizados na referida base de dados, entre os quais foram selecionados 15 conforme os critérios de inclusão (Tabela 2).

Descritores por cruzamento	Estudos localizados	Selecionados
Atividade antimicrobiana AND plantas	72	14
Atividade antimicrobiana AND plantas AND bactérias patogênicas	8	1
Atividade antimicrobiana AND plantas AND bactérias patogênicas AND alimentos	5	0
Atividade antimicrobiana AND plantas AND bactérias patogênicas AND alimentos AND conservantes naturais	2	0
Total	87	15

Tabela 2. Cruzamento dos descritores no portal Periódicos CAPES.

Concluída a fase de identificação, descrita anteriormente, dos artigos localizados, realizou-se a seleção entre os 15 artigos, por meio da leitura do título e resumo. Foram excluídos os artigos com duplicidade e os que não eram condizentes com o objetivo do estudo, resultando na seleção de 10 artigos para leitura na íntegra (Figura 1).

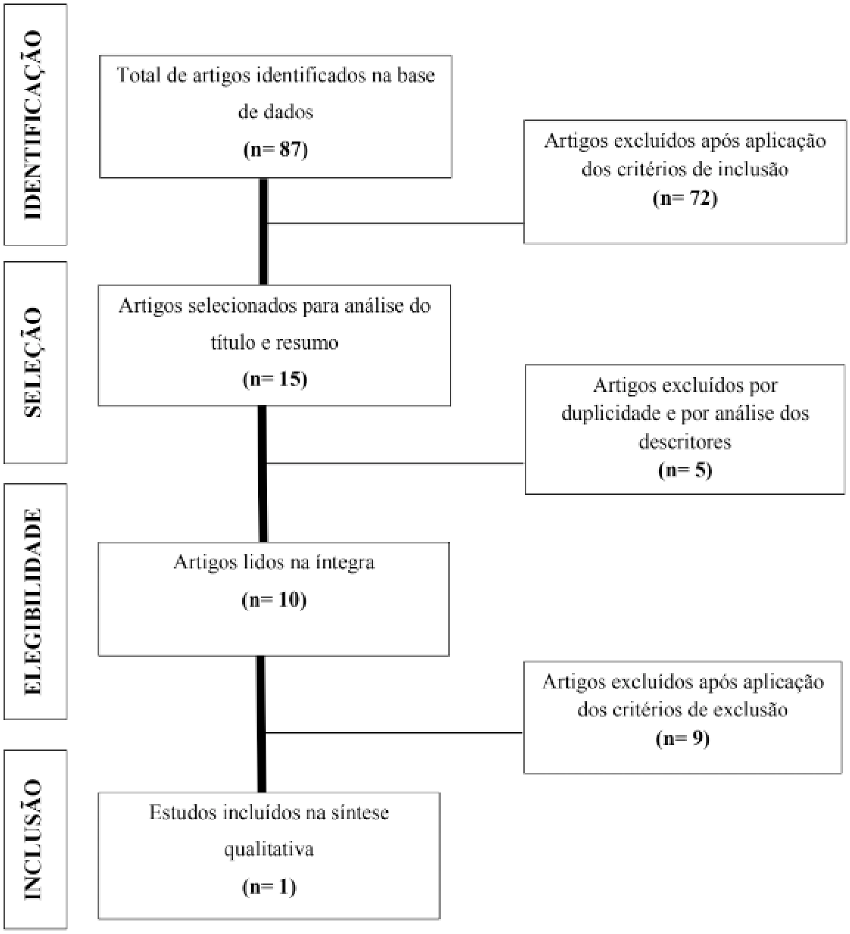


Figura 1. Fluxograma das etapas metodológicas utilizadas na revisão integrativa.

A revisão integrativa identificou que dos 10 artigos lidos na íntegra apenas um (1) respondeu ao objetivo do presente estudo (Figura 1, Quadro 1).

Nº	Título do artigo	Ano	Autores	Revista Científica
1	Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas	2016	Miranda et al.	Revista Ciência Agronômica

Quadro 1. Descrição dos estudos incluídos na revisão integrativa, segundo o título do artigo, ano de publicação, autores e revista científica.

O artigo avaliou a atividade antimicrobiana de Óleos Essenciais (OEs) de folhas frescas de *Coniza bonariensis*, *Parthenium hysterophorus, Tithonia diversifolia, Ambrosia polystachya, Hedychium coronarium* e *Baccharis dracunculifolia* frente às cepas de,

Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, *Salmonella Cholerasuis* e *Escherichia coli* e verificaram que os OEs das espécies *C. bonariensis*, *T. diversifolia*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia* desenvolveram atividade antimicrobiana eficiente tanto para as bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, enquanto que o óleo essencial de *A. polystachya* obteve potencial antibacteriano apenas para a cepa de *S. aureus* e a espécie *P. hysterophorus*, não inibiu o crescimento de nenhuma das cepas avaliadas. Então, com base nesses dados, a maioria dos OEs avaliados demonstrou ser uma fonte promissora para conservação dos alimentos.

10 l CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas e seus derivados têm sido propostos como alternativa natural aos aditivos químicos sintéticos, devido às várias propriedades bioativas que apresentam com destaque para a atividade antimicrobiana e antioxidante, no entanto, faz-se necessário a realização de estudos adicionais para determinar as condições mais adequadas de aplicação tecnológica desses conservantes naturais em alimentos.

REFERÊNCIAS

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Preventing Food Poisoning**. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/prevention.html>. Acesso em 04 de janeiro de 2022.

BAŞYIĞIT, B. et al. Compositional analysis, biological activity, and food protecting ability of ethanolic extract of Quercus infectoria gall. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 9, p. e14692, 2020.

DANNENBERG, G. S. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with Listeria monocytogenes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 120-127, 2016.

FERREIRA, M. J. G. et al. Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. e153953295-e153953295, 2020.

MACHADO, T. F; BORGES, M. F; BRUNO, L. M. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 21-27, 2011.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 213-220, 2016.

NASTASI, J. R. et al. Pectin-based films and coatings with plant extracts as natural preservatives: A systematic review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 120, p. 193- 211, 2022.

PISOSCHI, A. M. et al. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. **Oxidative medicine and cellular longevity**, p.1-36, 2016.

SULTANBAWA, Y. Plant extracts as natural antimicrobials in food preservation. In: **Microbial food safety and preservation techniques**. CRC Press, p. 392-401, 2014.

THIELMANN, J.; KOHNEN, S.; HAUSER, C. Antimicrobial activity of Olea europaea Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. **International Journal of Food Microbiology**, v. 251, p. 48-66, 2017.

ZHENG, Z. Ingredient technology for food preservation. **Industrial Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 28-33, 2014.

CAPÍTULO 2

EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTICÂNCER DA QUERCETINA NA PREVENÇÃO E REPARAÇÃO DE CELULAS CANCERIGENAS

Data de aceite: 01/02/2022

Fabricio de Jesus Mendes
Universidade Paulista – Campus Brasília
Brasília, DF
http://lattes.cnpq.br/4642009710894846

Lustarllone Bento de Oliveira
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga
Taguatinga, DF
http://lattes.cnpq.br/8523196791970508

João Marcos Torres do Nascimento Mendes
UNICEPLAC - União Educacional do Planalto Central
Gama, DF.
http://lattes.cnpq.br/6492142661477865

Águida Maiara de Brito
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga
Taguatinga, DF
http://lattes.cnpq.br/9974074193835939

Gabriel Lipinski de Farias
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga
Taguatinga, DF
http://lattes.cnpq.br/5462125337413000

Anna Heloísa Lemos Barbosa
Faculdade LS – Unidade Taguatinga
Taguatinga, DF
http://lattes.cnpq.br/9031850669170858

Paula Lauane Araújo
Universidade de Brasília – Campus Gama, Gama, DF
http://lattes.cnpq.br/4518970225359639

Thâmara Machado e Silva
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga
Taguatinga, DF
http://lattes.cnpq.br/5884172366712671

Giselle da Paz Cavalcanti
Universidade Paulista – Campus Brasília
Brasília, DF
http://lattes.cnpq.br/9772721787112443

Joselita Brandão de Sant'Anna
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga
Taguatinga, DF
http://lattes.cnpq.br/7307926945059462

Tulio Cesar Ferreira
Centro Universitário ICESP – Unidade Águas Claras
Águas Claras, DF
http://lattes.cnpq.br/8973534977251583

Alexandre Pereira dos Santos
Centro Universitário ICESP – Unidade Águas Claras
Águas Claras, DF
http://lattes.cnpq.br/2750971103839625

Melissa Cardoso Deuner
Faculdade Anhanguera de Brasília – Unidade Taguatinga
Taguatinga, DF
http://lattes.cnpq.br/1858895763510462

RESUMO: A quercetina é o principal flavonoide da dieta humana e vem sido estudada a algumas décadas. Encontrada em frutos, vegetais e bebidas é um composto bastante eficaz na proteção de células e outras moléculas principalmente através da captura de espécies reativas de oxigênio (ROS). É uma molécula com funções antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer, sua ação não está somente na proteção de células saudáveis, mas também na reparação ou destruição de células tumorais através de vários mecanismos e diferentes vias, como: apoptose, bloqueando proteínas anti-apoptóticas e liberando proteínas pró-apoptóticas, Necroptose também pode ser regulada de maneira controlada através de vias de transdução de sinal definidas causando graves lesões nas células tumorais e destruindo-as por necrose, também promove um aumento na autofagia estimulando uma maior ciclagem de nutrientes na célula, bloqueando a multiplicação celular tumoral e inibindo a angiogênese de células tumorais, bloqueando o canal para o avanço de metástase. Estudar e pesquisar a ação da quercetina em diversas linhagens de células cancerígenas e suas vias metabólicas de ação nas inúmeras funções exercidas por essa molécula é fundamental em pesquisas para o tratamento antineoplásico.
PALAVRAS-CHAVE: Quercetina, Câncer, Apoptose, Autofagia, Antioxidante, Anticâncer, Células cancerígenas, Necroptose.

ANTIOXIDANT AND ANTICANCER EFFECT OF QUERCETIN IN THE PREVENTION AND REPAIR OF CANCEL CELLS

ABSTRACT: Quercetin is the main flavonoid in the human diet and has been studied for a few decades. Found in fruits, vegetables and beverages, it is a very effective compound in protecting cells and other molecules mainly through the capture of reactive oxygen species (ROS). It is a molecule with antioxidant, anti-inflammatory and anticancer functions, its action is not only in the protection of healthy cells, but also in the repair or destruction of tumor cells through several mechanisms and different pathways, such as: apoptosis, blocking anti-apoptotic proteins and releasing pro-apoptoric proteins, Necroptosis can also be regulated in a controlled manner through defined signal transduction pathways causing severe damage to tumor cells and destroying them by necrosis, it also promotes an increase in autophagy stimulating a greater cycling of nutrients in the cell , blocking tumor cell multiplication and inhibiting tumor cell angiogenesis, blocking the channel for the advancement of metastasis. Studying and researching the action of quercetin on various cancer cell lines and their metabolic pathways of action in the numerous functions performed by this molecule is fundamental in research for anticancer treatment.
KEYWORDS: Quercetin, Cancer, Apoptosis, Autophagy, Antioxidant, Anticancer, Cancer cells, Necroptosis.

1 | INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um problema de saúde pública. No Brasil, a maior prevalência é o de mama para mulheres, enquanto para os homens o de próstata é o mais comum. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, em 2030, haverá 27 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo e 17 milhões de mortes pela doença. Os países em

desenvolvimento serão os mais afetados, entre eles o Brasil (BRASIL, 2021).

É uma doença influenciada por fatores multifatoriais, sendo externas ou internas ao organismo, estando inter-relacionadas. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos/costumes próprios de uma sociedade, incluindo neste último, os hábitos alimentares da população. As causas internas, na maioria das vezes são pré-determinadas geneticamente estando associada à capacidade do organismo de se defender das causas externas. Com o crescente aumento de casos de câncer no mundo, a população vem se preocupando em mudar o estilo de vida e os hábitos alimentares.

Nas últimas décadas o número de pacientes portadores de câncer tem crescido exponencialmente em todo o mundo, segundo ao INCA (Instituto do câncer) no ano de 2018 ocorreram cerca de 18 milhões de novos casos em todo o planeta e 9,6 milhões de óbitos pela doença. No Brasil no ano de 2020 foram contabilizados 626,03 mil novos casos e 232 mil óbitos registrados, a neoplasia tem sido um grande desafio para ciência, em busca de novos tratamentos e maneiras mais eficientes de se confirmar o diagnóstico (INCA BRASIL, 2020).

Com o surgimento de novos estudos e pesquisas realizadas in vitro e in vivo com ajuda da tecnologia foram encontrados diversos fatores, que induzem o surgimento de tumores assim como sua proliferação e ganho de massa. O Aumento de alimentos industrializados, assim como o manuseio de produtos químicos de forma incorreta, exposição excessiva a materiais radioativos entre outros, tem contribuído para esse aumento extraordinário nos casos de câncer.

Após muitas pesquisas e experimentos foram desenvolvidos alguns tipos de tratamentos eficazes, porém muitos deles de extrema agressividade para o organismo humano como nos casos de uso de quimioterápicos e sessões de radioterapia. Entretanto também foram encontradas várias moléculas com ações antioxidantes que inibem ou corrigem mutações celulares pontuais podendo ser um dos grandes avanços da ciência em relação ao câncer. Uma delas é a quercetina, um flavonoide que possui ação antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer. Que está presente em diversos alimentos em diferentes níveis de concentração.

O capítulo abordará a ação da quercetina nos diferentes mecanismos de reparação e inibição de células mutantes causadoras de tumores com grande concentração de massa.

2 | FLAVONOIDES

Os flavonoides são importantes compostos na dieta humana diária, mesmo sendo considerados sem valor nutritivo. Sua estrutura é constituída por um núcleo flavânico formado por 2 anéis benzênicos ligados por um anel pirano heterocíclico. São consumidos diariamente e estão presente em frutas, vegetais, bebidas e grãos. Seu consumo diário estipulado está entra 50 a 500 mg distribuídos em diferentes tipos: Auronas, calconas,

dihidrocalconas, flavonas (apegenina, lutedina, dosmetina) flavonóis (quercetina, miracetina, kaempfero). (BEHLING *et al*., 2020)

Possuem importante papel, não só na dieta humana, mas também desempenham importantes funções em: folhas, flores e frutos, que podem ser de proteção contra os raios solares ou defesa contra fungos (BEHLING *et al*., 2020).

Entre os medicamentos anticâncer e preventivos do câncer, os flavonóides são os mais estudados. São compostos que podem controlar diversas funções em etapas específicas do processo carcinogênico como a inibição da proliferação celular e indução de apoptose em diversas linhagens de células cancerígenas. Também demonstram uma substancial atividade antioxidante, não apenas por inibir a geração e a captura de espécies reativas de oxigênio (ROS), mas também por afetar a atividade de diversas enzimas desintoxicantes, como ciclooxigenases, lipoxigenases e óxido nítrico sintase induzível. Essa capacidade antioxidante dos flavonóides pode ser responsável por sua potência anticâncer. Os flavonóides também podem influenciar as alterações epigenéticas pela remodelação da cromatina (HASHEMZAEL *et al*., 2017).

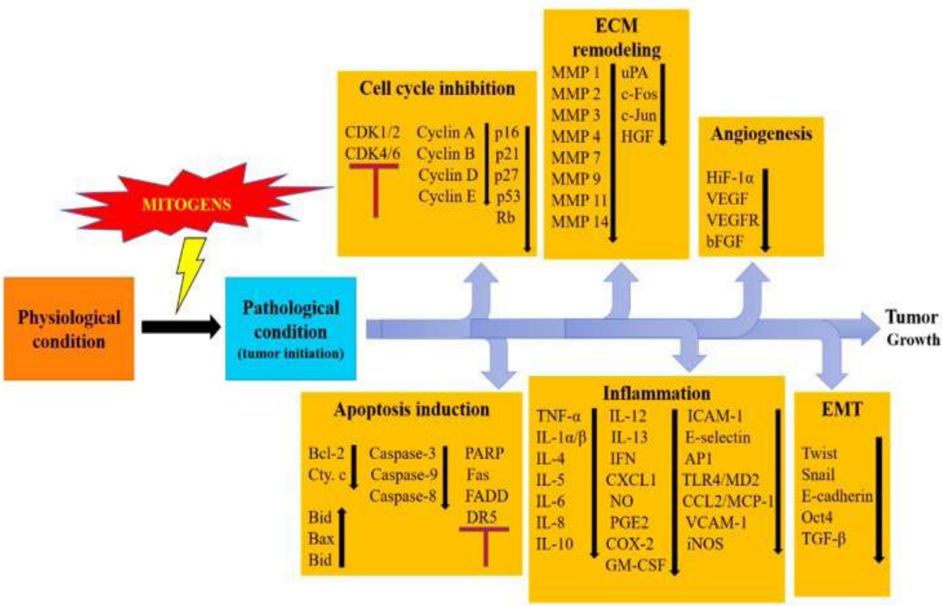


Figura 1. Efeitos dos flavonoides ligados ao câncer.

Fonte: KASHYAP *et al.,* 2019. Fisetin e Quercetin: Flavonoides promissores com potencial quimioprevitivo. Disponível em: Fisetin e Quercetin: Flavonoides promissores com potencial quimioprevitivo (nih.gov).

3 I QUERCETINA

A quercetina (3, 5, 7, 3', 4' pentahidroxi flavona) é uma molécula com potente ação

antioxidante, antiviral, anti-inflamatório anticâncer e psicoestimulante, pertence à classe dos flavonoides e desempenha inúmeras e importantes ações moleculares com diferentes funções que serão abordados neste estudo. O nome é usado desde 1857, e é derivado do *quercetum* (floresta de carvalho), em homenagem a *Quercus*. Em plantas é um inibidor de transporte de auxina polar de ocorrência natural (LI *et al*., 2016).

Possui 5 hidroxilas anexadas nas posições 3, 5, 7, 3′, e 4′ e também um anel catecol que pode sofrer metabolização oxidativa até sem desmetilar, o que a torna uma molécula com grande capacidade de capturar elétrons e alto poder de interação com outras moléculas e células (LI *et al*., 2016).

É o principal flavonoide consumido na dieta humana diária, é encontrada principalmente em sua forma glicosilada em vários tipos de alimentos como na cebola (284-486mg/kg), couve (100mg/kg), vagem (32 – 45mg/kg), brócolis (30mg/kg), tomate (14mg/kg), também é encontrada em bebidas como: Cerveja, café, vinhos e achocolatados, com teor mais baixo de 1mg/l com exceção do chá preto que mesmo estando classificado como bebida, teve a maior concentração entre elas com aproximadamente 10-25mg/l (BEHLING *et al*., 2020).

A natureza da glicosilação é conhecida por influenciar a eficiência de sua absorção como a Quercetina (C15H10O7) é um aglycone, sem um açúcar ligado. É um brilhante cristal de agulha amarela citron e totalmente insolúvel em água fria, mal solúvel em água quente, mas bastante solúvel em álcool e lipídios. Um quercetin glicoside é formado anexando um grupo de glicosyl (um açúcar como glicose, rhamnose ou rutinose) como um substituto para um dos grupos OH (LI *et al*., 2016).

A quercetina é um composto único devido ao seu alto potencial em combater diversas linhagens de câncer de uma maneira multidirecionada, estudos investigaram a atividade anticâncer da quercetina e obtiveram resultados surpreendentes. Tem sido relatado que a quercetina a várias concentrações e tempo de indução, suprime o crescimento de tumores de várias linhagens de células cancerígenas, incluindo câncer de mama, colo-rectal, estômago, cabeça e pescoço, pulmão, ovário, bexiga, melanoma e leucemia. Também inibe a liberação de P-glicoproteína na linha celular MCF-7 e aumenta a atividade anticâncer *in vitro* da adriamicina na linha celular de câncer de mama (HASHEMZAEL *et al*., 2017).

Foi constatado que sua principal via de ação é por meio do mecanismo do domínio de morte celular na superfície celular o que leva a indução a apoptose de várias linhagens de células cancerígenas sessando assim seu crescimento e proliferação, envolvendo efeitos antioxidantes e a supressão do gene p53 e da proteína BCL-2 suprimindo a transcrição do gene, o que diminui os efeitos inibitórios da proteína BAD na mitocôndria, considerada o iniciador de apoptose via intrínseca. Quando o p53 é inibido, as células se tornam mais suscetíveis à citotoxicidade induzida pela quercetina. Além disso, a quercetina ativa o domínio que leva à ativação de FAS e FADD induzindo a morte celular em várias linhagens de células cancerosas por meio da ativação da caspase 8. Foi observado um aumento

significativo na taxa de sobrevivência e uma redução significativa no volume do tumor em animais tratados com quercetina (HASHEMZAEL *et al.*, 2017).

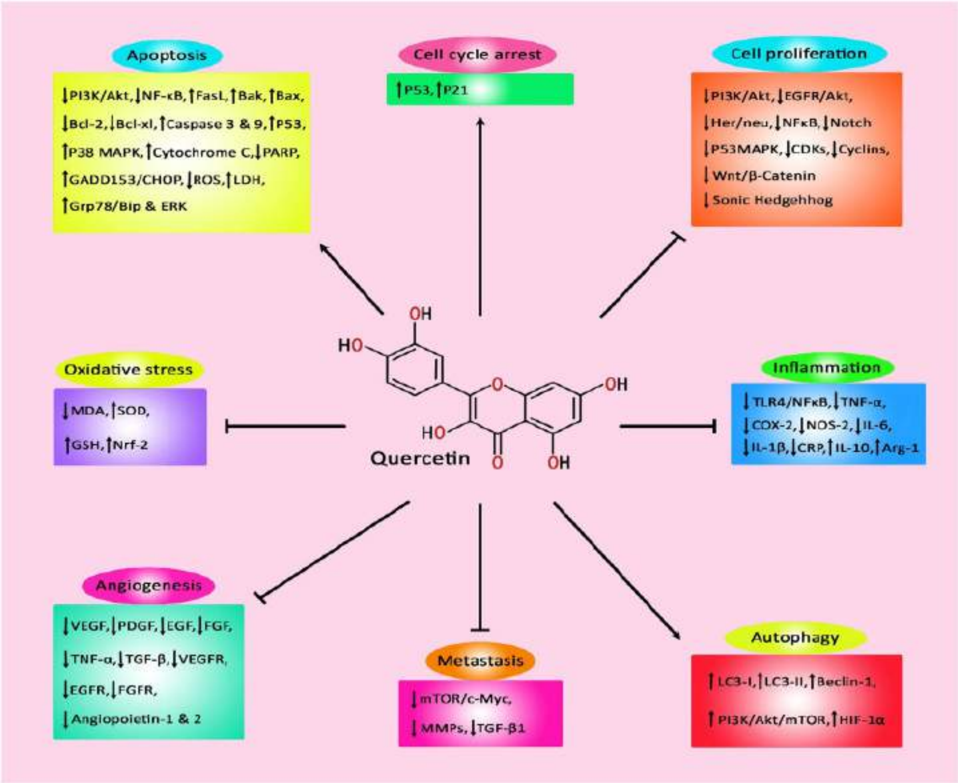


Figura 2. Funções da quercetina no metabolismo.

Fonte: *FARD et All 2021.* Impacto emergente da quercetina no tratamento do câncer de próstata. *Disponível em: Impacto emergente da quercetina no tratamento do câncer de próstata - ScienceDirect.*

3.1 Ações metabólicas e formas encontradas

Após diversos estudos realizados em todo mundo, foram encontradas várias funções celulares únicas para a quercetina, que podem melhorar o desempenho mental/físico e reduzir o risco de infecção. Essas propriedades formam a base para potenciais benefícios para a saúde geral e resistência a doenças, incluindo atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antivirais, antioxidantes e psicoestimulantes, bem como a capacidade de inibir a peroxidação lipídica, agregação plaquetária e permeabilidade capilar, e estimular a biogênese mitocondrial (LI *et al.*, 2016).

Como um excelente antioxidante in vitro, sua atividade antioxidante se manifesta principalmente afetando a glutationa, atividade enzimática, espécies reativas de oxigênio (ROS) e regulando vias de transdução de sinal, como NRFB, MAPK e AMPK (FARIAS, 2019).

A quercetina também pode ativar apoptose através de uma via mitocondrial

envolvendo a ativação do caspase-3 e caspase-9 e pela liberação de citocromo c e decote de PAR PP em leucemia linfoblástica aguda (HPB-ALL e HL-60) e células cancerígenas da próstata (DU-145 e PC-3). Além disso, uma gama de estudos mostrou modulação proteica anti-apoptótica (Bcl-xL e Bcl-2) e modulação proteica pró-apoptótica (Bax) pela quercetina em células de cólon humano, adenocarcinoma e leucemia (POZO, 2019).

É um composto muito importante na proteção de células ou de outras moléculas como as proteínas. Os efeitos anticâncer da quercetina incluem sua capacidade de promover a perda de viabilidade celular, autofagia através da modulação de caminhos PI3K/Akt/mTOR, Wnt/β-catenin e MAPK/ERK1/2 (POZO, 2019).

Age também como um carniceiro ROS eficaz, e exerce os efeitos antioxidantes pela atividade de limpeza radical livre, reduzindo o nível ROS e inibindo a peroxidação lipídica. Não há dúvida de que a quercetina também pode desempenhar fortes efeitos anti-inflamatórios e reduzir o processo de inflamação (TANG *et al.*, 2020).

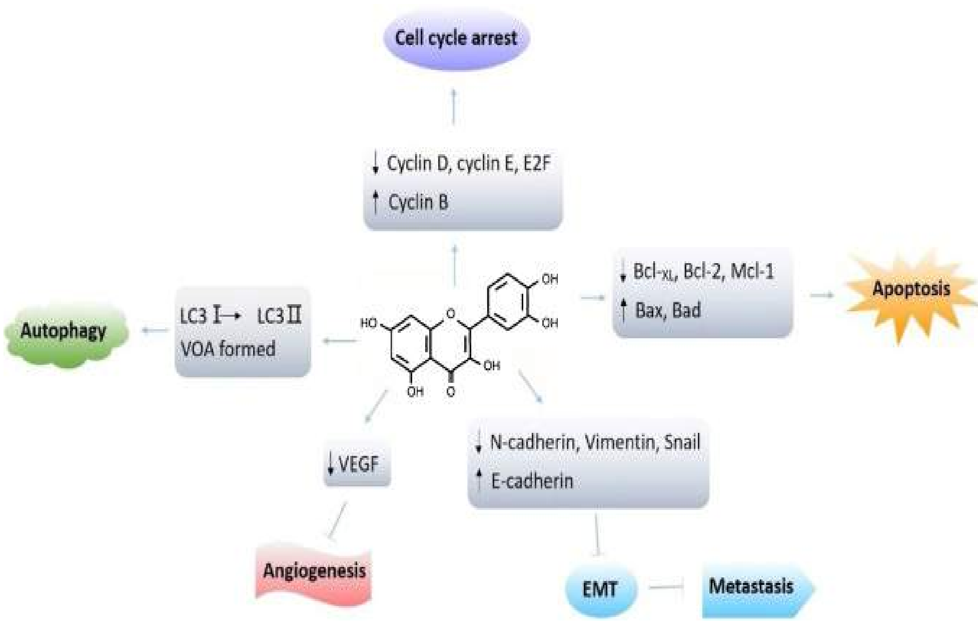


Figura 3. Efeito anticâncer da quercetina.

TANG *et al.,* 2020. Disponível em: Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects – ScienceDirect.

Geralmente é encontrado nos alimentos na forma glicosilada, às vezes, como -licosidase. A natureza da glicosilação é conhecida por influenciar a eficiência de sua absorção. Embora a quercetina-3-rutinosídeo seja uma forma importante da quercetina encontrada nos alimentos, a sua biodisponibilidade é de apenas 20% da quercetina-4'-glicosídeo (BEHNING *et al.*, 2020),

Um quercetin glicoside é formado anexando um grupo de glicosyl (um açúcar como glicose, rhamnose ou rutinose) como um substituto para um dos grupos OH O grupo glicosyl anexado pode alterar os efeitos solubilidade, absorção e *in vivo* (LI *et al*., 2016).

Quando a quercetina é absorvida no trato gastrointestinal, é metabolizada por enzimas de fase II que estão nas células epiteliais do estômago e intestinos. Os metabólitos parecem se acumular nos tecidos após o consumo de vegetais ricos em quercetina (RAUF *et al*., 2018).

O que nos mostra o caminho por onde a quercetina e seus derivados provavelmente são absolvidos pelo organismo, Entre os derivados da quercetina, as formas conjugadas de seus glicosídeos são melhor absorvidas do que a quercetina. Os glucósidos de quercetina purificados são capazes de interagir com os receptores de transporte de glicose dependentes de sódio no epitélio mucosa e, portanto, podem ser absorvidos pelo intestino delgado *in vivo (LI et al*., *2016).*

Após a absorção, a quercetina torna-se metabolizada em vários órgãos, incluindo intestino delgado, cólon, fígado e rim. Metabólitos formados no intestino delgado e fígado por enzimas de biotransformação incluem as formas metiladas, substituídas por sulfo e glucuronidas (HOLLMAN, 2009).

3.2 Células Cancerígenas

São células que contém e acumulam algum erro grave que não pôde ser reparado pela maquinaria celular, desregulando assim sua replicação e crescimento, podendo acometer outras células, sejam elas próximas ou em locais mais distantes. A desregulamentação da proliferação celular é um pré-requisito para a carcinogênese. Uma única célula geneticamente alterada causa proliferação anormal, o que leva ao crescimento de uma população de células tumorais clonalmente derivadas. As células cancerígenas podem continuar a crescer e se dividem mesmo que não recebam os sinais químicos para este processo. As células normais, só realizam o processo de crescimento e divisão se receberem sinalização química de receptores específicos (POZO, 2019).

Nas células cancerosas, a reprogramação metabólica é regulada por várias vias, incluindo o fosfoinositide 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt), que promove um aumento da absorção de glicose e da glicólise. Pi3K traduz o sinal através de mensageiros que ativam a Akt e, então, completamente ativo, a via PI3K/Akt regula a angiogênese celular, metabolismo, crescimento, proliferação, sobrevivência, síntese proteica, transcrição e a apoptose. Conseguem bloquear as vias apoptóticas impedindo assim a célula tumoral de ser destruída (POZO, 2019).

No entanto, para que isso seja possível, a produção de biomassa e energia são peças-chave para permitir e sustentar o crescimento e a expansão celular descontrolada. Como o ambiente tumoral é bastante limitado em nutrientes, é importante que essas células tenham um mecanismo para suportar a demanda energética por proliferação e

crescimento celular. Da mesma forma, foi descrito que uma mudança no metabolismo da glicose chamada “Efeito Warbug” que ocorre em células cancerosas (FARIAS 2019).

Em contraste, a maioria das células cancerígenas produzem grandes quantidades de lactato, independentemente da disponibilidade de oxigênio e, portanto, seu metabolismo é frequentemente referido como “glicólise aeróbica”. Warburg originalmente é a hipótese que as células cancerígenas desenvolvem um defeito nas mitocôndrias que leva à respiração aeróbica prejudicada e a uma dependência subsequente do metabolismo glicólitico (HEIDEN *et al*., 2009).

Mesmo que as células tumorais produzam menos ATP e de forma menos eficiente, elas não param de se desenvolver e se proliferar de maneira lenta. O metabolismo da glicose ao lactato gera apenas 2 ATPs por molécula de glicose, enquanto a fosforilação oxidativa gera até 32 ATPs após a oxidação completa de uma molécula de glicose. Isso nos sugere a questão de porquê um metabolismo menos eficiente, pelo menos em termos de produção de ATP, seria selecionado para a proliferação de células. (HEIDEN *et al*., 2009).

No entanto, a glicólise aeróbica continua sendo o mecanismo metabólico preferido para as células cancerosas porque a produção de biomassa é priorizada sobre a produção de energia. Nesse sentido, nas células cancerosas, a glicólise gera altos níveis de intermediários metabólicos ricos em carbono que poderiam ser utilizados como precursores para a nova síntese de nucleotídeos, lipídios ou aminoácidos (FARIAS 2019).

3.3 Efeito antioxidante da quercetina

Muitos compostos foram descobertos pela ciência e cada um deles desempenhando inúmeras funções diferentes e únicas. Um desses compostos foram os antioxidantes que desempenham um papel importantíssimo na proteção das células e das macromoléculas. A quercetina além de outras funções possui atividade antioxidante que se manifesta principalmente através de seu efeito sobre a glutationa (GSH), atividade enzimática, vias de transdução de sinal e espécies reativas de oxigênio (ROS) causadas por fatores ambientais e toxicológicos. A quercetina mostra uma forte atividade antioxidante mantendo o equilíbrio oxidativo (XU *et al*., 2019)

Também possui efeitos preventivos contra tumores gástricos, próstata, colón, bexiga, pulmão, mama e ovário. A Quercetina não só possui propriedades antioxidantes fortes na eliminação dos radicais livres, mas também reduz a inflamação, inibe a proliferação celular e a angiogênese (ARAUJO *et al*., 2015).

Com isso, após diversas pesquisas realizadas com o tema temos evidências de que os antioxidantes podem ser uma boa escolha na intervenção terapêutica junto à quimioterapia por auxiliar na redução do tamanho do tumor e no aumento da longevidade dos pacientes (ROCHA 2018).

4 I EFEITOS DA QUERCETINA NO CÂNCER DE CÓLON

Pesquisas sobre a quercetina demonstram seu efeito em várias linhagens de câncer uma delas é o câncer de cólon que é o segundo com maior incidência em mulheres e o terceiro em homens e foi constatado que em indivíduos suplementados com quercetina, há a possibilidade de inibição da formação de tumor do cólon e proliferação de células do tumor. A substância demonstra ter propriedades anti-inflamatórias, o que é consistente com os efeitos de prevenção. Além disso, também possui um papel na prevenção do câncer de cólon e na atividade sinérgica com os agentes quimioterapêuticos, invertendo a resistência a múltiplas drogas (ARAUJO *et al*., 2015).

No tratamento do câncer de cólon a quercetina demonstrou ser bastante eficaz juntamente com medicamentos quimioterápicos. A administração oral da quercetina para a prevenção do câncer em uma dieta suplementada com 2% de quercetina reduziu significativamente o aparecimento de câncer colo retal. Além disso, estudos *in vitro* atestaram sua capacidade em inibir a proliferação de células cancerígenas de cólon de diferentes linhagens. Entretanto, em um estudo clínico fase 1 realizado na Universidade de Birmingham para a avaliação da eficácia não tóxica e anticancerígena da quercetina em pacientes com câncer terminal, nenhum paciente obteve resposta radiológica convencional de acordo com os critérios da OMS, apesar das indicações favoráveis de sua atividade anticancerígena (HASHEMZAEI *et al*.,. 2017)

A quercetina (0-200 µM, incubação de 24 h e 0-300 µ, 5 dias de incubação) inibiu a viabilidade celular das linhas de células cancerígenas de cólon e atestou ser um composto lipofílico que é capaz de atravessar as membranas celulares e iniciar múltiplas vias de sinalização intracelular implicadas na quimioprevenção. Várias investigações relataram os potenciais efeitos anticâncer da quercetina em grandes tipos de câncer com suas habilidades únicas de dupla função como pró-oxidante e antioxidante (HASHEMZAEI *et al*., 2017).

5 I EFEITOS DA QUERCETINA NO CÂNCER DE PRÓSTATA.

O câncer de próstata é o segundo com maior mortalidade entre os homens, perdendo apenas para o câncer de pulmão. A quercetina demonstrou eficácia em vários estudos in vitro realizadas em várias linhagens de células tumorais de próstata. O tratamento de Quercetina diminuiu significativamente a viabilidade celular das células PCa (LNCaP, DU-145 e PC-3) de forma dependente de tempo e dose, sem afetar as células epiteliais prostáticas normais (PrEC) (WARD *et al*., 2018).

Além disso, o tratamento da quercetina também resultou em uma relação Bcl-xL atenuada para bcl-xS e translocação aumentada da proteína Bax para membrana mitocondrial em células cancerígenas da próstata humana LNCaP. Estudos in vitro com linhas de células cancerígenas humanas Queratinócitos HaCaT, estabeleceram o efeito

anti-tumorigênico da quercetina através da superexpressão de Bax e liberação de citocromo c e translocação de fatores que induzem apoptose ao núcleo (KASHYAP, *et al*., 2019).

O efeito da quercetina nas células do câncer de próstata se dá principalmente pela dissociação de Bax de Bcl-xL e a estimulação de famílias de caspases provocando cascatas e assim desbloqueando vias pró-apoptóticas . A inibição da angiogênese é outro efeito da quercetina. As vias EGFR / PI3K / Akt / ERK1 / 2, NFκB, Wnt e AKT / mTOR / P70S6K são influenciadas pela quercetina nas células do câncer de próstata. Seus efeitos antiangiogênicos e seu resultante exito liberando vias pró-apoptoticas nos fazem crer que a quercetina pode ser um grande agente na prevenção de metástases tumorais não apenas de próstata mas também de outras linhagens de câncer (GHAFOURI-FARD *et al*., 2021).

Também pode potencializar os efeitos de outras opções terapêuticas contra o câncer de próstata. Por exemplo, uma combinação de TRAIL e quercetina foi apontada como uma nova modalidade para o tratamento do câncer de próstata. Esses tipos de estratégias podem superar a resistência à apoptose em células cancerosas desbloqueando vias anti-apoptóficas. Além disso, a combinação de quercetina com paclitaxel ou docetaxel exerceu efeitos terapêuticos benéficos nos modelos animais de câncer de próstata, reduzindo os efeitos colaterais dos agentes quimioterápicos mencionados e aumentando a qualidade de vida dos portadores da doença em tratamento. O impacto da reversão da resistência ao docetaxel da quercetina apoiou a aplicação clínica desta substância no câncer de próstata resistente ao docetaxel. Com base na heterogeneidade dos mecanismos de promoção do câncer, tais terapias combinadas podem ser eficazes no tratamento do câncer, pois podem afetar diferentes mecanismos no processo carcinogênico. No entanto, a dose e a duração mais eficazes da quercetina em seres humanos devem ser identificadas nos ensaios clínicos, como a quercetina demonstrou afetar a expressão de várias proteínas, os níveis de expressão desses alvos em cada indivíduo podem afetar a resposta a essa droga em seres humanos (JUNG *et al*., 2010).

6 I EFEITOS DA QUERCETINA NO CÂNCER DE OVÁRIO.

O câncer de ovário é a segunda neoplasia ginecológica mais prevalente no Brasil, ficando atrás apenas do câncer do colo do útero. Dos casos confirmados 95% do total de neoplasias ovarinas é derivada das células epiteliais que revestem o ovário, os 5% restantes são de células germinativas que formar os óvulos e células estromais que produzem grande parte dos hormônios femininos (INCA BRASIL 2021).

Várias pesquisas demonstraram que a quercetina induz apoptose através das vias intrínsecas e dependentes de caspase. Também evocou o estresse endoplasmático do ânticulo (ER) no câncer de ovário, resultando em apoptose mediada por mitocôndrias. Além disso, a quercetina foi capaz de induzir a autofagia que tem um papel protetor nas células cancerígenas do ovário. Contudo a quercetina induziu estresse, apoptose e autofagia

através de um eixo p-STAT3/Bcl-2 (SHAFABAKGHSH, ASEMI 2019)

Outro estudo demonstrou que a quercetina diminui a viabilidade e induziu apoptose das células cancerígenas metastáticas do ovário, podendo diminuir várias moléculas anti-apoptóticas, incluindo Bcl-2 e Bcl-xL e aumentar moléculas pró-apoptóticas, incluindo caspase-3, caspase-9, Bid, Bax, Bad e citocromoma c. Além disso, a quercetina inibe o crescimento de células cancerígenas metastáticas do ovário pela indução de apoptose mediada por mitocondria. Em um estudo recente, foram examinados efeitos anticâncer da nano-formulação de quercetina, esta forma inibiu significativamente o crescimento de células cancerígenas de ovário, tanto in vitro quanto em camundongos com câncer de ovário xenoenxerto. Após ser formulada atestou induzir apoptose ativando caspase-3, caspase-9 e Bax, e reduzindo MCL-1 e Bcl-2 (SHAFABAKGHSH, ASEMI 2019).

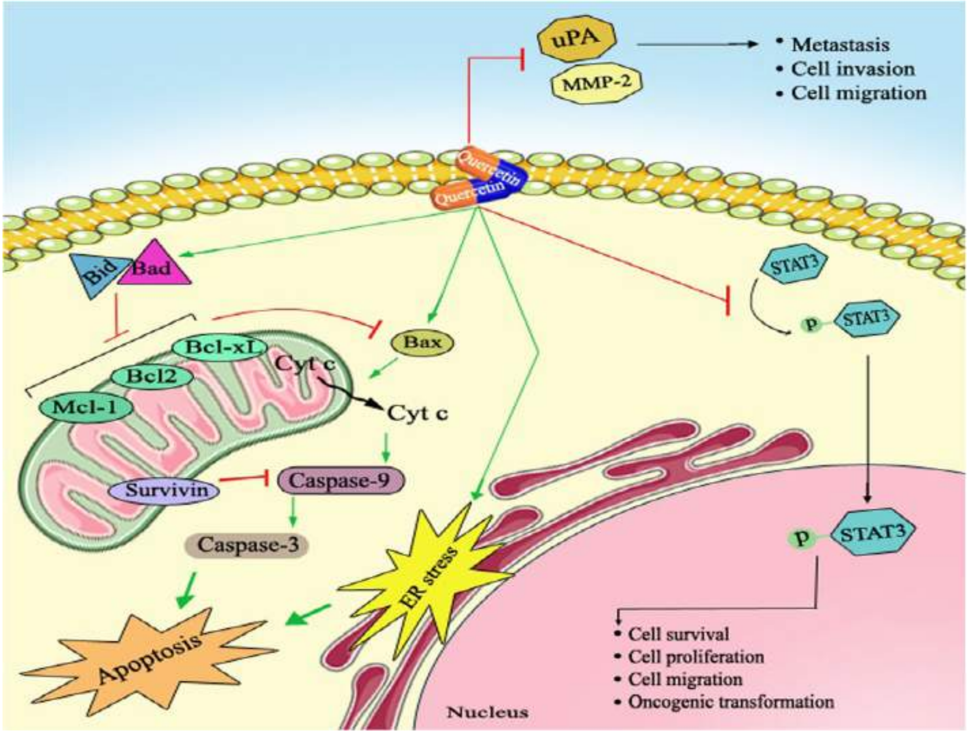


Figura 4. Diferentes vias de sinalização usando quercetina como uma nova estratégia terapêutica no tratamento do câncer de ovário:

Fonte: SHAFABAKHSH et al., 2019. Quercetina: um composto natural para tratamento de câncer de ovário. Disponível em: Quercetina: um composto natural para tratamento de câncer de ovário (nih.gov).

7 I EFEITOS DA QUERCETINA NO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, sendo este também o com maior taxa de mortalidade entre elas, porém mesmo sendo menos reincidente também

pode acometer indivíduos do sexo masculino. Tratamentos convencionais não tem sido muito efetivo contra essa linhagem de câncer que atingem células mamárias, a principal causa do então insucesso dá-se sobre seus efeitos colaterais e a forma evolutiva deste tipo de câncer. O que nos leva em busca de novas descobertas para que obtenhamos melhores resultados (INCA BRASIL, 2020).

A quercetina foi estudada em linhagens de células de câncer de mama MCF-7, e mais uma vez demonstrou grande capacidade de reação juntamente com os tratamentos convencionais, suprimindo o crescimento de células MCF7 estimulando a apoptose e necroptose através da sinalização de tose. O papel do apoptose foi determinado utilizando o inibidor pan-caspase Z-VAD, que se liga de forma irreversível ao cateter no sítio lítico de caspases e foi usado para inibir de maneira seletiva o caminho da apoptose. Na presença de Z-VAD a viabilidade celular aumentou significamente em comparação com sua ausência. Já na presença do inibidor de necroptose Nec-1, a viabilidade celular aumentou em comparação a ausência de Nec-1. Além disso o inibidor Nec-1 aumentou ainda mais a viabilidade celular em comparação com Z-VAD, e foi um pouco mais eficaz na proteção de células cancerosas (KHORSANDI *et al*., 2017).

A Apoptose é regulada em parte pelo gene Bcl-2 que aumenta a sobrevivência celular e da proteína pró-apoptótica Bax. A inibição da apoptose depende parcialmente do equilíbrio entre Bcl-2 e Bax. As células MCF-7 tratadas com quercetina exibiram um grande número de núcleos com a cromatina condensada o que indica apoptose celular (KHORSANDI *et al*., 2017).

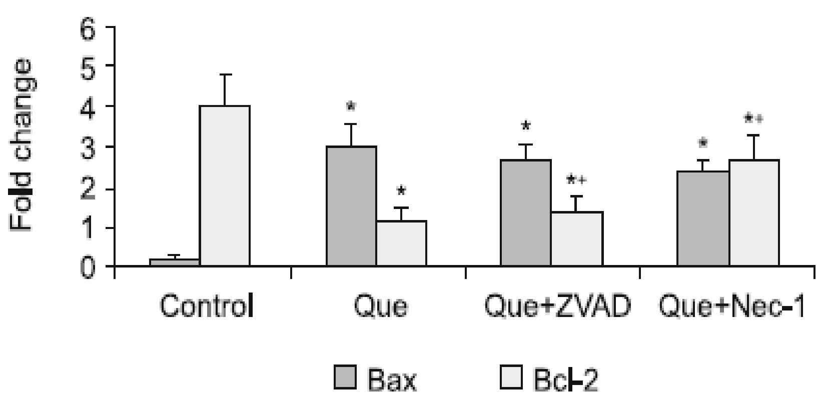


Tabela 1: Efeito da quercetina sobre Bax e Bcl-2.

Fonte: KHORSANDI *et al*., 2017. A quercetina induz apoptose e necroptose na mama MCF - 7células cancerosas. Disponível em: Quercetin induz apoptose e necroptose em células cancerígenas de mama MCF-7 - PubMed (nih.gov).

A necrose por muito tempo foi considerada uma maneira acidental de morte celular, porém estudos relataram recentemente que assim como a morte por apoptose a necroptose também pode ser regulada de maneira controlada através de vias de transdução de sinal definidas (KHORSANDI *et al*., 2017).

A quercetina também foi testada em combinação com outras terapias, quando adiminstrada com uma variedade de agentes quimioterápicos, foi observada acentuada potencialização dos efeitos anticâncer, foi detectado apoptose a níveis de expressão de mRNA e além disso foi mostrada que a quercetina sensibiliza as células MCF-7 ao medicamente doxorrubicina(Dox) que é utilizado para tratamentos de doenças neoplásicas incluindo o câncer de mama (DHANARAJ *et al*., 2021).

Nas doenças malignas de mama, o fator de crescimento epidérmico desempenha um importante papel, através da propagação do crescimento e proliferação celular por angiogênese e metástase. A quercetina baseado em nanoparticulas causou uma redução significativa na expressão de várias proteínas, incluindo Vimetina, Snail, N-caderina, Slug, MMP-2, MMP-9, Akt e PI3K e GSK3ß atenuando ou até inibindo o aumento tumoral, ampliando a longevidade dos pacientes e diminuindo os efeitos de tratamentos radioterápicos e quimioterápicos (RAUF *et al*., 2018).

8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Quercetina mostrou-se uma molécula com grande potencial metabólico, realizando diversas funções na proteção de células saudáveis e macromoléculas, principalmente através da captura de espécies reativas de oxigênio (ROS). Também demonstrou sua ação reparatória em células tumorais especialmente através de apoptose e necroptose retardando ou destruindo a célula tumoral, sendo bastante ativa na reparação e eliminação parcial de diversas linhagens de células cancerígenas como, mama, próstata, intestino, cólon e ovário.

Foi atestado sua eficácia como um futuro tratamento alternativo sendo menos invasivo e com resultados gratificantes, também comprovou sua eficácia em conjunto com tratamentos convencionais, aumentando sua ação nas células tumorais e diminuindo as reações adversas, melhorando o bem-estar e o estilo de vida de pacientes testados em tratamento de câncer.

Entretanto sua aplicabilidade depende muito de dosagem e tempo, mesmo a quercetina sendo uma molécula com poderosa função antioxidante e anti-inflamatória ela também possui propriedades pró-oxidantes, quando usada em altas dosagens e por longos períodos pode passar de uma ação benéfica para algo danoso as células e ao organismo humano gerando um excessivo estresse oxidativo por meio da inibição dos sistemas antioxidantes. Ou seja, em alguns casos não é eficaz, levando a resultados inesperados e negativos. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias e compostos terapêuticos

continua sendo um grande desafio na batalha contra o câncer e outras doenças.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Instituto do câncer**. Brasília 2021. Disponível em: Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer acesso: 02 de setembro de2021

ARAUJO *et al*., 2015.**ANTIOXIDANTES NA PREVENÇÃO DO CÂNCER EM IDOSOS.** Disponível em: cliente=13-41ec4af2d1b366b9c09361970b1bdecc.pdf (fiponline.edu.br) acesso: 08/05/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde**. Brasília 2021. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21003-inca-estina-que-havera-596-070-novos-casos-de-cancer-em-2021>Acesso em: 26 de abril de 2021.

BRASIL. **Instituto do câncer**. Brasília 2021. Disponível em: Estatísticas de câncer - INCA - Instituto Nacional de Câncer acesso em: 24 de abril de 2021

BRASIL. **Instituto do câncer**. Brasília 2021. Disponível em: Estimativa 2020 - Introdução - INCA - Instituto Nacional de Câncer acesso em: 24 de abril de 2021.

FARIAS M., POZO C. **O Efeito Anticâncer da Quercetina: Implicações Moleculares no Metabolismo do Câncer.** Disponível em: IJMS | Free Full-Text AMetabolism (mdpi.com), acesso em: 25 de abril de 2021.

HASHEMZAEL *et al*., 2017.**Efeitos indutores de anticancerígenos e apoptose de quercetina *in vitro*** e ***in vivo.***

HEIDEN M.G, CANTLEY L.C., THOMPSON C.B. **Entendendo o Efeito Warburg:** Os Requisitos Metabólicos da Proliferação Celular.

Hollman, P.C.; Katan, M.B. **Absorção, metabolismo e biodisponibilidade de flavonoides. Em** *Flavonoides em Saúde e Doenças;* **Rice-Evans, C.A., Packer, L., Eds. Marcel Dekker Inc.: Nova Iorque, NY, EUA, 1998; pp. 483-522.Acesso dia 06/05/2021.**

KASHYAP *et al*., 2019**. Fisetin e Quercetin: Flavonoides promissores com potencial quimiopreventivo**. Disponível em: Biomolecules | Free Full-Text | Fisetin and Quercetin: Promising Flavonoids with Chemopreventive Potential | HTML (mdpi.com) acesso em: 11/05/2021.

LI, *et al*., **Quercetina, Inflamação e Imunidade.** Disponível em: Nutrients | Free Full-Text | Quercetin, Inflammation and Immunity | HTML (mdpi.com). Acesso 05/05/2021.

ROCHA, SOUZA, 2018. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPLEXOS CONTENDO QUERCETINA E ÍONS COBRE.**

TANG, *et al*., 2020. Disponível em: **Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects** – ScienceDirect. Acesso em: 06/05/2021.

WARD *et al*., 2018. **Quercetina inibe o câncer de próstata atenuando a sobrevivência celular e inibindo vias anti-apoptóticas.** Disponível em: Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways | World Journal of Surgical Oncology | Full Text (biomedcentral.com). Acesso em: 11/05/2021.

GHAFOURI-FARD *et al*., 2021. **Impacto emergente da quercetina no tratamento do câncer de próstata.** Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221003334 acesso em 11/09/2021.

JUNG *et al*., 2010. **Quercetin aumenta apoptose induzida por TRAIL em células cancerosas da próstata através do aumento da estabilidade proteica do receptor de morte 5.** Disponível em: **Quercetin aumenta apoptose induzida por TRAIL em células cancerosas da próstata através do aumento da estabilidade proteica do receptor de morte 5 (nih.gov)** acesso em: 04/10/2021.

KHORSANDI *et al*., 2017 **A quercetina induz apoptose e necroptose na mama MCF - 7células cancerosas,** disponível em: Quercetin induz apoptose e necroptose em células cancerígenas de mama MCF-7 - PubMed (nih.gov) acesso: 8/09/2021.

HEIDEN, CANTLEY, THOMPSON 2009. **Entendendo o Efeito Warburg: Os Requisitos Metabólicos da Proliferação Celular.** Disponível em: Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation (nih.gov). Acesso em: 06/05/2021.

BRUNA PAOLA, MURINO RAFACHO 2020. **Minieditorial: Quercetina Melhora o Perfil Lipídico e Apolipoproteico em Ratos Tratados com Glicocorticoides em Altas Doses.** Disponível em: https://www.scielo.br/j/abc/a/T96SMKYvPC5BsLdMpmHvVVh/?lang=en&format=pdf. Acesso em: 02/09/2021.

FARD *et al*., 2021. **Impacto emergente da quercetina no tratamento do câncer de próstata.** Disponível em: Impacto emergente da quercetina no tratamento do câncer de próstata - ScienceDirect acesso em: 06/10/2021.

OZKAN, BAKAR 2020. **Potenciação do efeito da lonidamina por quercetina na mama humana MCF-7 células cancerosas por meio de regulação negativade expressão de mRNA de MMP-2/9** Disponível em: SciELO - Brasil - Potentiation of the Effect of Lonidamine by Quercetin in MCF-7 human breast cancer cells through downregulation of MMP-2/9 mRNA Expression acesso em: 06/10/2021.

RAUF *et al*., 2018. **Potencial anticâncer da quercetina: uma revisão abrangente** Disponível em: Potencial anticâncer de quercetina: Uma revisão abrangente - PubMed (nih.gov). Acesso em: 06/10/2021.

SHAFABAKGHSH, ASEMI 2019. **Quercetina: um composto natural para tratamento de câncer de ovário.** Disponível em: **Quercetina: um composto natural para tratamento de câncer de ovário (nih.gov)**. Acesso em: 06/10/2021.

RAUF, *et al*,, 2018. **Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review.** Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30039547. Acesso em: 27/10/2021.

CAPÍTULO 3

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA PRÓPOLIS *E SEU USO*

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 11/02/2022

Willams Alves da Silva
Universidade Federal do Ceará – UFC
Fortaleza – CE
https://orcid.org/0000-0002-4603-3049

Vanessa Gomes Amaral Almeida
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0001-5641-3654

Sônia Pereira Leite
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Recife- PE
https://orcid.org/000-0002-0634-9735

Mary Anne Medeiros Bandeira
Universidade Federal do Ceará – UFC
Fortaleza - CE
https://orcid.org/0000-0003-0550-8308

Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Recife- PE
https://orcid.org/0000-0001-7496-8207

Renatha Claudia Barros Sobreira
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Recife- PE
https://orcid.org/0000-0002-7931-674X

Marlon Claudener dos Santos Dantas
Universidade Federal de Sergipe- UFS
São Cristóvão - Sergipe
https://orcid.org/0000-0003-3827-4448

Pedro Victor da Rocha Noé
Centro Universitário CESMAC
Maceió – AL
https://orcid.org/0000-0002-7574-1765

Juliana de Paula dos Santos Silva
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0001-6782-2664

Isabela Malta Maranhão
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0002-6867-8892

Larissa Temoteo de Albuquerque
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL
Maceió – AL
https://orcid.org/0000-0001-7928-1332

Kristiana Cerqueira Mousinho
Centro Universitário CESMAC e Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0003-0985-3336

RESUMO: A própolis é uma substância natural resinosa que as abelhas *Apis mellifera L.* coletam dos botões das árvores, fluxos de seiva ou outras fontes botânicas da região, e, posteriormente, misturam-nas com suas próprias enzimas salivares e cera de abelha. Desta forma, a seguinte pesquisa tem por objetivo abordar aspectos relacionados aos diferentes tipos de própolis e suas possíveis aplicações

farmacológicas. Trata-se de uma revisão integrativa descritiva. Foram realizadas buscas nas bases eletrônicas de dados PubMED, Lilacs e SciELO, utilizando-se os seguintes descritores: Própolis, atividade farmacológica e produtos naturais. Foram selecionados 26 artigos, no período de publicação de 2010 até 2020. Os resultados apontam que, após a coleta de 500 amostras de própolis em diferentes regiões do Brasil. pode-se classificar 12 tipos diferentes de própolis. Dentre as principais atividades farmacológicas que ela apresenta destaca-se: ação antimicrobiana, tendo ação descrita contra bactérias, fungos e protozoário. Quanto ao seu efeito antibacteriano, a própolis possui ação principalmente contra microrganismos gram-positivos, assim como as espécies *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus.* Dentre os gram-negativos, a própolis tem efeito significante contra *Escherichia coli.* Outras aplicações têm sido atribuídas a este material, como antiinflamatório, antitumoral, anticarcinogênico, anti-hipertensivo, cicatrizante, curativo, antihepatotóxico e modulador do sistema imune. Concluiu-se que estudos dessa natureza são necessários para servir de base para novas pesquisas, sejam elas experimentais, laboratoriais ou de campo, visando melhor elucidar outras espécies de própolis, pois esse material é tão abundante que pode ser uma grande variedade de campos do conhecimento são explorados pela maioria das pessoas.
PALAVRAS-CHAVE: Própolis. Atividade farmacológica. Produtos naturais.

PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF PRÓPOLIS AND ITS USE

ABSTRACT: Propolis is a natural resinous substance that *Apis mellifera* L. bees collect from tree buds, sap flows or other botanical sources in the region, and subsequently mix them with their own salivary enzymes and beeswax. Thus, the following research aims to address aspects related to the different types of propolis and their possible pharmacological applications. This is an integrative descriptive review. Searches were carried out in the electronic databases PubMED, Lilacs and SciELO, using the following descriptors: Propolis, pharmacological activity and natural products. 26 articles were selected, in the period of publication from 2010 to 2020. The results show that, after collecting 500 samples of propolis in different regions of Brazil. 12 different types of propolis can be classified. Among the main pharmacological activities that it presents stands out: antimicrobial action, having described action against bacteria, fungi and protozoa. As for its antibacterial effect, propolis has an action mainly against gram-positive microorganisms, as well as the Enterococcus spp species. and Staphylococcus aureus. Among gram-negative, propolis has a significant effect against Escherichia coli. Other applications have been attributed to this material, such as anti-inflammatory, antitumor, anticarcinogenic, antihypertensive, healing, curative, antihepatotoxic and immune system modulator. It was concluded that studies of this nature are necessary to serve as a basis for further research, whether experimental, laboratory or field, in order to better elucidate other species of propolis, as this material is so abundant that it can be used in a wide variety of fields of knowledge. are exploited by most people.
KEYWORDS: Propolis. Pharmacological activity. Natural products.

1 | INTRODUÇÃO

A palavra própolis é originada do grego, em que “pro” significa “na entrada de” e

“polis” significa “cidade”, sendo esta utilizada pelas abelhas para defesa contra outros insetos e microrganismos, assim como para reparação das colmeias (SALGUEIRO; CASTRO, 2016). A própolis é uma substância natural resinosa que as abelhas *Apis mellifera L.* coletam dos botões das árvores, fluxos de seiva ou outras fontes botânicas da região, e, posteriormente, misturam-nas com suas próprias enzimas salivares e cera de abelha (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2016).

Entre as décadas de 1950 e 1960, a própolis foi usada para tratar problemas de saúde em alguns países da Europa Oriental (Polônia e República Tcheca) e na Europa Ocidental, América do Sul, América do Norte e Japão em 1980. Tornou-se importante na medicina complementar e alternativa na década de 1980 e atualmente é utilizado na indústria farmacêutica (YUMNAM *et al.*, 2017).

Apresenta inúmeras aplicações no tratamento de diversas doenças devido às suas propriedades anti-sépticas, antiinflamatórias, antioxidantes, antibacterianas, antimicóticas, antifúngicas, antiúlcera, anticâncer e imunomoduladoras (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2016; ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018; ANJUM, 2019).

De acordo com a pesquisa de Almuhayawi (2020), foram identificadas mais de 300 substâncias na própolis, entre as quais estão os seguintes componentes: os flavonoides (galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina), além dos aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumá- rico), ácidos orgânicos (ácido benzóico), ácidos e ésteres alifáticos.

Desta forma, conhecer os principais efeitos farmacológicos descritos na literatura sobre a própolis, principalmente a encontrada na região brasileira, correlacionando com a sua composição química, busca compreender melhor a perspectiva de novas formas farmacêuticas, mantendo a própolis em evidência com o intuito de influenciar novos e mais recentes estudos sobre a mesma dentro da medicina popular.

Diante deste contexto, esta pesquisa tem por objetivo abordar aspectos relacionados aos diferentes tipos de própolis e suas possíveis aplicações farmacológicas.

2 | METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão integrativa descritiva. Foram realizadas buscas nas bases eletrônicas de dados PubMED, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Scientific Electronic Library Online – SciELO. utilizando-se os seguintes descritores: Própolis, atividade farmacológica e produtos naturais. Foi utilizado o operador booleano AND na busca dos artigos. A partir das referências obtidas, procedeu-se à leitura dos artigos, reservando-se a consulta a resumos somente para uma mínima quantidade destes trabalhos, quando não havia possibilidade de acesso à integralidade dos mesmos. Foram selecionados 26 artigos, sendo que toda essa produção, após identificada, foi catalogada, resumida e submetida à categorização, procurando estabelecer similaridades

e contrastes de conteúdos. Como critérios de inclusão: Período de publicação de 2010 até 2020, artigos completos publicados em revistas indexadas em português e inglês, e que debatessem a temática. Foram excluídos literatura científica indisponíveis na íntegra, artigos em outros idiomas, documentos em outros formatos como teses e dissertações e publicados fora do período estabelecido na pesquisa.

3 I REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Composição química

A própolis é um produto natural classificado como remédio terapêutico, ou seja, é um medicamento obtido das glândulas, órgãos, tecidos e secreções de animais e, no caso da própolis, das secreções salivares das abelhas. Os componentes fenólicos, como os flavonóides, são os compostos isolados mais comuns, e grande parte de suas propriedades terapêuticas dependem de sua combinação com outros componentes menos comuns, como derivados do ácido cinâmico e diterpenos (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018).

O melhor indicador da origem vegetal da própolis é analisar a composição química com possíveis origens vegetais (AGUIAR *et al*., 2018). Dessa forma, a composição da própolis reflete diretamente a flora utilizada pelas abelhas (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018).

Vários são os fatores que afetam a composição química da própolis (clima, espécies de abelhas e flora local) e refletem as características biológicas do produto de forma decisiva (ANJUM et al., 2019). Embora a composição química da própolis seja um dado muito importante, sua atividade farmacológica única também pode ser atribuída à sinergia entre seus diversos compostos químicos (SANTOS; DAVID, 2017).

A composição química da própolis é altamente variável devido à biodiversidade vegetal de cada região visitada pelas abelhas (SANTOS; DAVID, 2017). Até o momento, cerca de 300 compostos químicos foram identificados na própolis, tais como: resina e bálsamos (50-70%), cera (30-50%), óleos essenciais (10%), pólens (5-10%), aminoácidos, minerais, vitaminas A, B e E, fenóis e compostos aromáticos (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018).

Amostras tropicais de própolis, especialmente a própolis brasileira, apresentam diferenças significativas na composição química em comparação com a própolis em regiões temperadas. Por esse motivo, a própolis brasileira tornou-se objeto de grande interesse para os cientistas (AMARANTE et al., 2006). A própolis verde brasileira produzida em São Paulo e Minas Gerais consiste principalmente de derivados prenilados do ácido p-cumárico e possui grande quantidade de flavonoides, muitos dos quais não estão presentes em própolis da Europa, América do Norte e Ásia (AMARANTE *et al*., 2006).

O principal componente é um composto fenólico, que se caracteriza pela presença

de pelo menos um grupo hidroxila diretamente conectado ao anel aromático. Essas substâncias na própolis são representadas por flavonóides agliconas, ácidos fenólicos e seus ésteres, os quais são responsáveis por resistir às atividades biológicas de diversos microrganismos patogênicos (ALI; KUNUGI, 2020).

A existência desses diversos compostos fenólicos (principalmente flavonoides) explica, em certa medida, as várias propriedades terapêuticas relatadas por diversos pesquisadores. A aplicação médica da própolis está cada vez mais interessada em sua composição química e origem (ALI; KUNUGI, 2020). Porém essa característica de panacéia (várias atividades biológicas) dificultavam sua aceitação, pois médicos e outros profissionais foram designados a dezenas de atividades biológicas ao mesmo tempo e tendem a duvidar de sua eficácia (KUROPATNICKI *et al.*, 2013; ALMUHAYAWI, 2020).

Além das atividades antimicrobianas e reguladoras do sistema imunológico, a ingestão de flavonoides também interfere em alguns processos fisiológicos, contribui para a absorção e ação das vitaminas e atua como antioxidante durante o processo de tratamento (SANTOS *et al.*, 2020).

Diferentes técnicas estão disponíveis para separação e purificação dos componentes químicos da própolis, esses métodos incluem técnicas como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia gasosa (GC), espectroscopia de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (NMR) (AHANGARI; NASERI; VATANDOOST, 2018).

A palavra flavonoide tem origem no latim *flavus*, que significa amarelo. Braakhuis (2019), explicou que o conceito de flavonóides inicialmente incluía apenas o grupo de composto de cor amarela. Mas hoje, o termo também inclui compostos menos coloridos e incolores, bem como antocianinas vermelhas ou azuis. Esses compostos constituem uma grande classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre em humanos, mas são encontradas em produtos comestíveis diários como vegetais, feijão, frutas, chás de ervas, mel e própolis. Estruturalmente, os flavonoides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15), dispostos em uma configuração C6-C3-C6, como pode ser observado na Figura 1.

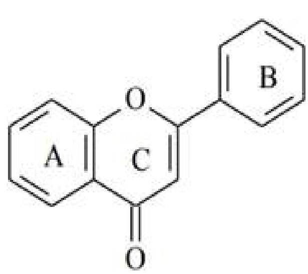


Figura 1: Estrutura básica dos flavonoides.

Fonte: Kuropatnicki et al., (2013).

3.2 Conceito da própolis e tipos

O termo própolis foi descrito na França no século 16, mas foi somente em 1908 que apareceu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e "composição", incluído no "Chemical Abstracts". Também conhecida como *bee glue*, a própolis consiste em um composto resinoso e balsâmico derivado de exsudatos de plantas, como materiais lipofílicos nas folhas, germes, látex e resinas e secreções salivares de abelhas (*Apis mellifera*) (AGUIAR *et al*., 2018).

Existem diversos tipos de própolis, os quais são definidos, baseando-se, principalmente, na origem vegetal, que está intimamente relacionada com a flora local, local de coleta e características climáticas e geográficas da região, que resulta em composições físico-químicas diferentes (CORDEIRO *et al*., 2018).

Em uma pesquisa realizada por Alotaibi e colaboradores (2019), foram coletadas 500 amostras de própolis em diferentes regiões do Brasil. Após o processamento e análise da aparência e cor dos extratos dessas amostras, o espectro de absorção na região do UV-visível e o perfil da Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), podem-se classificar 12 tipos diferentes de própolis, cujos resultados estão listados na Quadro 1.

Grupos	**Cor**	**Substâncias Solúveis (%)**	**Origem da própolis**
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	"
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	"
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	"
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	"
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	"
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	"
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	"
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	"
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	"
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Quadro 1 – Classificação das própolis brasileiras. Extrato Etanólico de Própolis.

Fonte: ALOTAIBI *et al.*, 2019.

Um modo de classificação da própolis é quanto a coloração apresentada que pode variar entre verde, marrom, vermelha e amarela. A própolis verde tem como principal origem botânica a *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), também conhecida como alecrim selvagem. As abelhas utilizam dos brotos e folhas do alecrim silvestre para obtenção de uma substância resinosa verde (ALMUHAYAWI, 2020). Já a própolis marrom

possui variabilidade quanto sua origem botânica podendo advir de *Luehea* sp. (Malvaceae), *Piptadenia falcate Benth* (Fabaceae), *Tabebuia* spp. (Bignoniaceae), *Tabebuia caraiba* (Mart.) *Bureau* (Bignoniaceae), *Vernonia* spp. (Asteraceae) e *Cecropia pachystachya Trécul* (Urticaceae) presente diferentes regiões do Brasil e Cuba (ALMUHAYAWI, 2020).

Encontrada na Venezuela, Cuba, México e China, e recentemente descoberta no Brasil, a própolis vermelha possui como fonte vegetal *Dalbergia ecastophyllum (L.) Taub.* (Fabaceae) e é conhecida popularmente como rabo-de-bugio, depositando exsudatos resinosos vermelhos na superfície e orifícios de seus ramos (BRAAKHUIS, 2019). Ainda, outra variante é a própolis amarela, encontrada em diversos partes de Cuba e também no Brasil e classificada quanto a sua origem de acordo com sua composição química e detecção de metabólitos secundários.

Segundo Búrquez e colaboradores (2014), a incorporação dos extratos de própolis verde e vermelha em filmes de curativos à base de colágeno tem uma reparação tecidual mais rápida e melhor na cicatrização de queimaduras na pele de ratos, sem causar efeitos alérgicos ou tóxicos. A variedade vermelha oferece os melhores resultados.

Tomando a própolis amarela como exemplo, De La Cruz-Cervantes e colaboradores (2018), afirma que existem poucas pesquisas sobre sua origem vegetal. Os componentes químicos proeminentes que apresentam este extrato de amostra são compostos alifáticos, tais como alcoóis triterpénicos e acetatos.

3.3 Uso e aplicações da própolis

Há muito a própolis tem sido utilizado para fins alimentícios e de bem-estar com descrição de uso desde 300 a.C (ALMUHAYAWI, 2020). Na antiguidade, os egípcios, gregos e romanos utilizaram a própolis para tratamento de lesões e embalsamento dos cadáveres. Ao longo da história, suas propriedades antissépticas, antipiréticas, antimicrobiana e antiinflamatórias foram descritas e se tornou um dos produtos naturais mais utilizados na área de cosméticos, farmacêutica e alimentos (SANTOS *et al.*, 2020).

A própolis de abelhas sem ferrão demonstrou seu potencial terapêutico, como atividade antibacteriana, antioxidante e antitumoral. Além disso, dentre as atividades biológicas da própolis de abelha, destacam-se os efeitos antibacteriano, antiviral, antifúngico e antiparasitário.Todos esses potenciais biológicos se devem à sinergia, que ocorre entre os componentes presentes em seus ingredientes, como flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres. A atividade antiviral da própolis e seus derivados tem sido descrita para importantes vírus em drogas e medicamentos veterinários, como o vírus do herpes humano tipo 1 (HSV1) e dois vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da influenza aviária, vírus do herpes bovino (BoHV) - 5) e Parvovírus Porcino (PPV), e comprovou os resultados promissores da própolis em vírus patogênicos humanos e animais (ANJUM *et al.*, 2019).

Dentre as principais atividades, a ação antimicrobiana da própolis possui destaque, tendo ação descrita contra bactérias, fungos e protozoários (ALOTAIBI *et al.*, 2019). Quanto

ao seu efeito antibacteriano, a própolis possui ação principalmente contra microrganismos gram-positivos, assim como as espécies *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus aureus.* Dentre os gram-negativos, a própolis tem efeito significante contra *Escherichia coli* (ANJUM *et al*., 2019).

Sua ação se dá através da reatividade de seus compostos aromáticos, como os flavonóides, destruindo parede celular, comprometendo a permeabilidade de membrana, alterando a função da membrana citoplasmática, inibindo do metabolismo energético, assim como interrompendo a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, reduzindo o desenvolvimento de biofilmes e resistência bacteriana (ALMUHAYAWI, 2020). O efeito antifúngico é principalmente contra espécies do gênero *Candida* e ação antiparasitária contra *Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi, Giardia lamblia, Trichomonas vaginalis, Toxoplasma gondii and G. duodenalis* (PEREIRA *et al*., 2015).

As infecções causadas pela levedura Candida são chamadas de candidíase ou candidose. Em pacientes com função imunológica enfraquecida, são classificadas como envolvimento superficial, da pele e das membranas mucosas e até mesmo infecções profundas, difusas e de alta gravidade, como da candidemia, em pacientes imunocomprometidos.

Segundo Machado e colaboradores (2012), múltiplos estudos comprovam o efeito da própolis na levedura, principalmente na Candida albicans, que por sua vez tem chamado a atenção de pesquisadores de todo o mundo sobre o uso da própolis. Devido às suas propriedades terapêuticas: antimicrobiana, anti-inflamatória, imunomoduladora, antioxidante, antitumoral e antiviral.

O uso da própolis para fins antioxidantes é bastante descrito. Esta propriedade ocorre devido à alta concentração de polifenóis em seus extratos. A galangina e pinocembrim são os principais componentes antioxidantes, em maiores concentrações em extratos aquosos (ANJUM *et al*., 2019). O mecanismo se dá através de doação de íons H^+ às espécies reativas de oxigênio, principal causa de oxidação de lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (PEREIRA FILHO; BICALHO; SILVA,2012). Estes radicais livres estão envolvidos em doenças, como Parkinson, Alzheimer, artrite, câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, indicando potencial uso da própolis nessas doenças (PEREIRA *et al*., 2017).

Outras aplicações têm sido atribuídas a este material, como antiinflamatório, antitumoral, anticarcinogênico, anti-hipertensivo, cicatrizante, curativo, antihepatotóxico e modulador do sistema imune (MORAIS *et al*., 2017; MEDEIROS *et al*., 2019).

De acordo com Neto e Dos Santos Pedreira (2010) a importância de se encontrar novos antifúngicos a partir dos recursos naturais e da própolis é cada vez maior, ao mesmo tempo que existe uma grande variedade de compostos ativos, muitos dos quais ainda são desconhecidos e com propriedades biológicas relatadas, o que pode levar à descoberta de novos organismos moleculares. Substâncias ativas tornam-se possíveis, usados para tratar doenças bucais.

4 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde os primórdios de nossa civilização, a própolis atrai a atenção humana por sua ampla aplicabilidade e inúmeros benefícios à saúde. Não só aumenta a imunidade e trata o câncer, mas também é muito eficaz contra vírus como herpes e gripe, bactérias como *Helicobacter pylori* e salmonela e fungos como *Candida albicans.*

Concluiu-se que pesquisas dessa natureza são necessárias para servir de base para novas pesquisas, sejam elas experimentais, laboratoriais ou de campo, visando melhor elucidar outros tipos de própolis, pois, este material é muito rico e pode ser explorado pelas mais diversas áreas do conhecimento.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. R. et al. Estudo Químico e Avaliação Biológica da Própolis Vermelha de Alagoas. **Revista Virtual de Química**, v.10, n.1, p. 282-296, 2018.

AHANGARI, Z; NASERI, M; VATANDOOST, F. Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. **Iranian endodontic journal** vol. 13,3 (2018): 285-292.

ALI, A. M; KUNUGI, H. Apitherapy for age-related skeletal muscle dysfunction (sarcopenia): A review on the effects of royal jelly, propolis, and bee pollen. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1362, 2020.

ALMUHAYAWI, M.S. Propolis as a novel antibacterial agente. **Saudi Journal of Biological Sciences,** v. 27, p. 3079–3086, 2020.

ALOTAIBI, A. et al. European propolis is highly active against trypanosomatids including Crithidia fasciculata. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p.181-193, 2019.

AMARANTE, J. F. et al. Composição química e atividade antimicrobiana de dois extratos de própolis contra isolados de Staphylococcus spp. e bactérias multirresistentes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 734-743, 2019.

ANJUM, S.I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1695–1703, 2019.

BANKOVA, V; POPOVA, M; TRUSHEVA, B. New emerging fields of application of propolis. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 35, n. 1, p. 1-11, 2016.

BRAAKHUIS, A. Evidence on the health benefits of supplemental propolis. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2705, 2019.

BÚRQUEZ, M. J.G. et al. In Vitro Activity of propolis on domestic animal viruses: A review. **Interciência**, v. 42, n. 5, p. 272-276, 2017CHANDNA, P. et al. Complementary and Alternative Medicine (CAM): a review of propolis in dentistry. **Technology**, v.4, p. 6, 2014.

CORDEIRO, A. R. et al. Composição química de duas variedades de própolis dos Campos Gerais do Paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 5, n. 1, 2015.

DE LA CRUZ-CERVANTES, J.A. et al. Propolis in aquaculture: A review of its potential. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, n. 3, p. 337-349, 2018.

KUROPATNICKI, A.K. et al. Historical aspects of propolis research in modern times. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 964149, 2013.

MACHADO, B. A. S. et al. Estudo prospectivo da própolis e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes depositados no Brasil. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 2, n. 3, p. 221-235, 2012.

MEDEIROS, H. H. et al. USO DE SOLUÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS COMO ANTIMICROBIANO E CICATRIZANTE EM FERIDAS CUTÂNEAS CAUSADAS POR ACIDENTE AUTOMOBILÍSTICO EM CÃO. **Archives of Veterinary Science**, v. 24, n. 2, p.1801-1813, 2019.

MORAIS, W. R. S. et al. ESTUDO PROSPECTIVO DO USO DA PRÓPOLIS COMO INIBIDOR DE CORROSÃO. **Cadernos de Prospecção**, v. 10, n. 3, p. 615, 2017.

NETO, J. G; DOS SANTOS PEDREIRA, M. Uso da própolis na nutrição de ruminantes. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 738-743, 2010.

ORYAN, A; ALEMZADEH, E; MOSHIRI, A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 469-483, 2018.

PASUPULETI, V.R. et al. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

PEREIRA, C. S.et al. Aplicação de extrato etanólico de própolis em doenças da cultura da soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 854-862, 2017.

PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2015.

PEREIRA FILHO, José Sales; BICALHO, Luiza; SILVA, Denise Aparecida. Uso de própolis associada a outros componentes no tratamento de feridas oncológicas após excisão. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 2, p. 15-25, 2012.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SANTOS, D. C. dos; DAVID, J. M; DAVID, J.P. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Química Nova**, v. 40, n. 2, p. 171-175, 2017.

SANTOS, L.M. et al. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, p. 1369–1382, 2020.

YUMNAM, R. et al. Effect of propolis in oral health. **Journal of Ayurveda and Integrated Medical Sciences (ISSN 2456-3110)**, v. 2, n. 1, p. 186-192, 2017.

CAPÍTULO 4

POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO *Croton heliotropiifolius* E SEU USO

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 11/02/2022

Willams Alves da Silva
Universidade Federal do Ceará – UFC
Fortaleza – CE
https://orcid.org/0000-0002-4603-3049

Vanessa Gomes Amaral Almeida
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0001-5641-3654

Sônia Pereira Leite
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Recife- PE
https://orcid.org/000-0002-0634-9735

Mary Anne Medeiros Bandeira
Universidade Federal do Ceará – UFC
Fortaleza - CE
https://orcid.org/0000-0003-0550-8308

Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Recife- PE
https://orcid.org/0000-0001-7496-8207

Renatha Claudia Barros Sobreira
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Recife- PE
https://orcid.org/0000-0002-7931-674X

Marlon Claudener dos Santos Dantas
Universidade Federal de Sergipe- UFS
São Cristóvão - Sergipe
https://orcid.org/0000-0003-3827-4448

Pedro Victor da Rocha Noé
Centro Universitário CESMAC
Maceió – AL
https://orcid.org/0000-0002-7574-1765

Juliana de Paula dos Santos Silva
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0001-6782-2664

Isabela Malta Maranhão
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0002-6867-8892

Kayo Costa Alves
Centro Universitário CESMAC
Maceió – AL
https://orcid.org/0000-0002-7788-820X

Kristiana Cerqueira Mousinho
Centro Universitário CESMAC e Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0003-0985-3336

RESUMO: Croton gênero heliotropiifolius Kunth, comumente conhecido como “velame”, “velaminho” e “velaminho-de-cheiro” por seus pelos finos, é endêmico do nordeste do Brasil e é comumente encontrado na vegetação de Caatinga, banhados, restingas e espessas. Portanto, tendo em vista a importância da análise fitoquímica e biológica de plantas para suas aplicações medicinais, este trabalho propõe uma revisão da literatura cientificamente comprovada

sobre C. heliotropiifolius e suas atividades farmacológicas. O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa da literatura. A fundamentação teórica do estudo incluiu pesquisa em bases eletrônicas de dados: *Scielo, Medline, Lilacs e Pubmed*, publicados entre os anos de 2010 a 2020, escritos em português e inglês. Os resultados apontam que, é uma espécie comumente encontrada no Brasil nas regiões Nordeste (compreendendo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (abarcando o Distrito Federal e Goiás) e Sudeste (englobando o estado de Minas Gerais). No uso popular, as espécies de *Croton* são comumente utilizadas sob a forma de chás e infusões para o alívio de dores, tratamento de distúrbios digestivos, hipercolesterolemia, antiinflamatórios, antiulcerogênicos, analgésicos, antidiabéticos e antimaláricos. Desta forma, a ação farmacológica das plantas se deve a de seus metabolitos secundários sendo de grande importância para o benefício e equilíbrio homeostático do vegetal. As plantas medicinais além de outorgar um tratamento efetivo e natural, traz também a vantagem de ser uma terapia de baixo custo e fácil acesso podendo ser cultivadas em hortas residenciais, quintais, sítios e até mesmo ser encontradas em feiras livres e lojas especializadas.
PALAVRAS-CHAVE: *Croton heliotropiifolius*. Farmacologia. Fitoterapia.

PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF *Croton heliotropiifolius* AND ITS USE

ABSTRACT: The species Croton heliotropiifolius Kunth, popularly known as “velame”, “velaminho” and “velaminho-de-cheiro” due to its tiny hairs, is endemic in Northeast Brazil and can be frequently found in the vegetation of the Caatinga, swamps, restingas and thick. Thus, aiming at the importance of phytochemical and biological analyzes of plants for their medicinal application, this work proposed to carry out a review of the literature on C. heliotropiifolius and its pharmacological activities already scientifically proven. The present study is a narrative review of the literature. The theoretical foundation of the study included research in electronic databases: Scielo, Medline, Lilacs and Pubmed, published between 2010 and 2020, written in Portuguese and English. The results indicate that it is a species commonly found in Brazil in the Northeast regions (comprising the states of Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte and Sergipe), Central-West (encompassing the Federal District and and Goiás) and Southeast (encompassing the state of Minas Gerais). In popular use, Croton species are commonly used in the form of teas and infusions for pain relief, treatment of digestive disorders, hypercholesterolemia, anti-inflammatory, antiulcerogenic, analgesic, antidiabetic and antimalarial. Thus, the pharmacological action of plants is due to their secondary metabolites being of great importance for the benefit and homeostatic balance of the plant. Medicinal plants, in addition to providing an effective and natural treatment, also have the advantage of being a low-cost and easy-to-access therapy, which can be grown in home gardens, backyards, farms and even be found in street markets and specialized stores.
KEYWORDS: *Croton heliotropiifolius*. Pharmacology. Phytotherapy.

1 I INTRODUÇÃO

O poder medicinal das plantas são tão primitivos quanto suas origens nos humanos.

Eles são dependentes do reino vegetal desde a antiguidade, o que fornece evidências empíricas de seu potencial farmacológico (ALMEIDA et al., 2017).

O uso tradicional de remédios à base de plantas tem sido o principal adjuvante medicinal dos cuidados de saúde. No entanto, com o avanço da tecnologia, surgiram novas abordagens farmacológicas, resultando em medicamentos industrializados (ALMEIDA et al., 2017). Esses tratamentos ganharam gosto e confiança modernos, minando o valor medicinal das plantas (ATHIÊ-SOUZA et al. 2019).

Em geral, os benefícios proporcionados pelo uso medicinal de espécies vegetais são promissores para a saúde desde que haja conhecimento prévio dos usos, vantagens e riscos. Como tal, os profissionais de saúde devem estar atentos aos seus usos tradicionais, atendendo aos valores culturais e de estilo de vida das comunidades que recebem o tratamento (BARRERA et al., 2016).

As mudanças socioeconômicas globais inspiraram modelos de saúde que, ao longo dos anos, levaram ao uso terapêutico da economia de recursos naturais esquecidos, permitindo que as plantas recuperassem espaço e competitividade com os medicamentos tradicionais (CARUZO; PEREIRA; CORDEIRO, 2019).).

No Brasil, o Ministério da Saúde destinou 6,7 milhões em 2012 ao projeto “Arranjos Produtivos Locais de Plantas Medicinais e Fitoterápicas do SUS”, com o objetivo de investir em equipamentos e materiais, contratação de profissionais e capacitação técnica para facilitar a interação, e o SUS agentes de produção, produção e distribuição de plantas medicinais e fitoterápicas (SILVA et al., 2017).

Dessa forma, a pesquisa fitoquímica e etnofarmacológica tem sido fundamental para ampliar o conhecimento sobre o uso comum dos extratos naturais, demonstrando cientificamente a atividade de seus constituintes e auxiliando na busca de princípios ativos contra diversas doenças (CARUZO; PEREIRA; CORDEIRO, 2019).).

Tais estudos são favorecidos pela disponibilidade de matérias-primas, diversidade de compostos, baixo custo, e os resultados muitas vezes superam os medicamentos existentes. Por exemplo, muitas hortaliças possuem atividade antimicrobiana de amplo espectro (ALMEIDA; RAMALHO; SILVEIRA, 2018).

O potencial de alguns extratos vegetais para retardar ou inibir a oxidação molecular por inibir reações oxidativas em cadeia confere efeitos protetores, tornando-os uma alternativa à medicina complementar (WINK, 2015), pois o estresse oxidativo crônico é a causa de muitas doenças degenerativas como: Asma, doenças gastrointestinais, doenças cardíacas, doenças autoimunes e doença de Alzheimer (CANUTO; SILVEIRA; BEZERRA, 2010). A região nordeste do Brasil possui uma rica diversidade de plantas medicinais, o que pode ser explicado pela interação de sua flora e diferentes culturas (ARRAIS et al., 2014).

O gênero croton heliotropiifolius Kunth, comumente conhecido como “velame”, “velaminho” e “velaminho-de-cheiro” por seus pelos finos, é endêmico do nordeste do Brasil e é comumente encontrado na vegetação de Caatinga, brejos, restingas (RODRIGUES et

al. 2017). Estudos com foco em C. heliotropiifolius encontraram a presença de alcalóides, polifenóis e compostos redutores que têm sido relatados para alívio da dor gástrica, disenteria e antipiréticos (DA SILVA et al., 2020).

Assim, visando à importância de análises fitoquímicas e biológicas de plantas para a sua aplicação medicinal, este trabalho propôs-se realizar uma revisão da literatura sobre o *C. heliotropiifolius* e suas atividades farmacológicas já comprovadas cientificamente.

2 | METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa da literatura. Esse tipo de revisão são publicações amplas apropriadas para descrever e discutir o estado da arte de um assunto específico, sob o ponto de vista teórico ou contextual, possibilitando a aquisição e atualização do conhecimento em curto espaço de tempo. Os critérios utilizados para avaliação e seleção de trabalhos são elaborados de forma aleatória, tendo em vista que esse tipo de revisão não possui metodologia para o levantamento de referências (BOTELHO; DE ALMEIDA CUNHA; MACEDO, 2011).

A fundamentação teórica do estudo incluiu pesquisa em bases eletrônicas de dados: *Scielo* (Scientific Electronic Library Online)*, Medline (*Literatura Internacional em Ciências da Saúde)*, Lilacs* (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências de Saúde)*, Pubmed* (National Library of Medicine). As palavras-chaves utilizadas foram: *Croton heliotropiifolius*. Farmacologia. Fitoterapia.

Buscaram-se os textos que se encontravam disponíveis na íntegra, publicados entre os anos de 2010 a 2020, os quais constituíram ensaios clínicos, artigos originais e revisões sistemáticas da literatura.

Como critérios de elegibilidade e inclusão dos artigos, analisaram-se a procedência da revista e indexação, estudos escritos em português e inglês.

3 | REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações Botânicas

3.1.1 Família Euphorbiaceae

A família Euphorbiaceae destaca-se entre as angiospermas ocupando os mais variados tipos de vegetação e habitats, principalmente nos trópicos e subtrópicos da América e África. Os membros desta família englobam cerca de 8000 espécies, 317 gêneros e 52 tribos (CREPALDI et al., 2016; TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

Na flora brasileira é conhecida como uma das maiores e mais complexas famílias da ordem Malpighiales, compreendendo 64 gêneros e 940 espécies. As espécies que formam o grupo de Euphorbiaceae são assiduamente citadas como pioneiras constituídas

por uma diversidade de plantas que vão desde grandes árvores, como por exemplo, *Hevea brasiliensis*, encontrada na selva amazônica, até ervas daninhas simples que crescem prostradas ao solo (CREPALDI et al., 2016; SODRÉ; SILVA, 2015; SANGHA; GAYATRI, 2014).

No que diz respeito à morfologia, são geralmente distinguida pela seiva leitosa (quando presente), folhas alternas, simples ou compostas, com estipulações, inflorescência cimosa, racemosa, espiciforme ou pseudantial, flores unissexuadas, geralmente monoperiantadas, em plantas monóicas ou dióicas, frutos esquizocarpo ou capsular, sementes com ou sem carúncula (SANGHA; GAYATRI, 2014; COSTA; SECCO; GURGEL, 2018).

Euphorbiaceae inclui um número de plantas que desempenham um importante papel no ramo econômico, como a mandioca (*Manihot esculenta*), que faz parte da alimentação base de boa parte do nordeste brasileiro através do consumo direto e da farinha de mandioca. A mamona (*Ricinus communis*), utilizada como matéria-prima para extração de óleo com diversos fins farmacêuticos e industriais. A seringueira (*Hevea brasiliensis),* conhecida pela produção de látex que compõe a maior parte (99%) da fabricação mundial de borracha natural (LAU et al., 2016; DRUMOND et al., 2019).

3.1.2 Gênero Croton

Croton é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae compreendendo aproximadamente 1300 espécies comuns na África, Ásia e América do Sul. O Brasil é o centro da diversidade de *Croton*, com mais de 350 espécies distribuídas em todo o bioma brasileiro (Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Caatinga), dentre as quais 68 destas espécies são encontradas apenas em Caatinga, tipo de vegetação exclusivamente brasileira. Sua ampla distribuição geográfica e sua considerável diversidade morfológica fazem com que o *Croton* seja considerado um grupo de alta complexidade taxonômica (OSATHANUNKUL et al., 2015).

O gênero *Croton* foi proposto por Linnaeus em 1753 ao descrever 13 espécies da Ásia e África na primeira edição de Species Plantarum. No Brasil, estudos recentes salientaram a alta diversidade de *Croton*, tais como: Sodré e Da Silva (2015), através de um levantamento taxonômico do gênero, na Floresta Nacional de Silvânia, identificaram dez espécies de *Croton.*

Posteriormente, Santos, Riina e Caruzo (2016) reconheceram 20 espécies no Estado do Espírito Santo, contribuindo para enriquecimento do conhecimento acerca do *Croton* na floresta atlântica e no Brasil.

Caruzo, Pereira e Cordeiro (2019), registraram a ocorrência de 40 espécies de *Croton* no estado de São Paulo, enquanto Farias; Medeiros; Riina (2019), descreveram a morfologia completa de uma nova espécie de sangue de dragão nominada como *Croton*

rizzinii, localizada na Serra dos Órgãos (RJ).

Athiê-Souza et al., (2019), forneceram um inventário focado na flora do Parque Nacional do Catimbau situado em Pernambuco, incluindo 613 espécies pertencentes a 85 famílias. A Euphorbiaceae ficou entre as três famílias mais ricas em espécies, com destaque para o *Croton* com um total de 18 spp, algumas destas: *C. heliotropiifolius* Kunth, *C. campestris* A. St. – Hill, *C. glandulosus L.*, *C. tricolor* Klotzsch ex Baill., *C. pedicellatus* Kunth.

A diversidade química apresentada por esse gênero oferece um arsenal de compostos com elevado potencial farmacológico devido à presença de diterpenos *labdano*, triterpenos, esteróides, alcalóides, substâncias fenólicas e flavonóides. Além destes metabólitos, muitas das espécies de *Croton* produzem óleos essenciais ricos em fenilpropanoides, mono e sesquiterpenoides (ALMEIDA; RAMALHO; SILVEIRA, 2018).

3.1.3 Considerações gerais sobre o Croton heliotropiifolius Kunth

O *Croton heliotropiifolius* Kunth (Figura 1), popularmente conhecido como “velame”, “velaminho” e “ velame-de-cheiro”, devido aos seus minúsculos pelos, é uma espécie comumente encontrada no Brasil nas regiões Nordeste (compreendendo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), Centro-Oeste (abarcando o Distrito Federal e Goiás) e Sudeste (englobando o estado de Minas Gerais) (SILVA et al., 2017 a; ARAÚJO et al.,2017).



Figura 1. Espécie *Croton heliotropiifoius* Kunth (Fonte: Autores, 2022).

Dependendo da sua localização, o *C. heliotropiifolius* mostra grande variação no tamanho e forma das folhas, cor da penugem e comprimento das inflorescências. Esta espécie apresenta-se como subarbusto ou arbusto com até dois metros de altura, provido de látex incolor, creme a avermelhado (quando oxidado). Os galhos têm forma cilíndrica e coloração cinza-esverdeado, quanto as folhas, são alternas e ligeiramente subopostas no ápice podendo possuir margem inteira ou serrilhada. As flores estão dispostas em inflorescências terminais, racemiformes, congestas. O fruto é uma cápsula, oblonga a subglobosa. Suas sementes são elípticas a oblongas, com tegumento castanho a preto. A época de floração e frutificação compreende os meses de maio e junho (OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2017b).

Na prospecção fitoquímica realizada por Rodrigues et al. (2017), foi identificada no extrato etanólico das folhas de *C. heliotropiifolius* a presença de taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavononóis, catequinas e xantonas.

3.1.4 Atividades farmalógicas do Croton heliotropiifolius

No uso popular, as espécies de *Croton* são comumente utilizadas sob a forma de chás e infusões para o alívio de dores, tratamento de distúrbios digestivos, hipercolesterolemia, antiinflamatórios, antiulcerogênicos, analgésicos, antidiabéticos e antimaláricos (ARRAIS et al., 2014; ARAÚJO et al., 2017).

Silva et al. (2017) avaliaram o efeito citotóxico do extrato metanólico de *Croton heliotropiifolius Kunth*, os resultados demonstraram uma porcentagem baixa a média de inibição do crescimento celular nas linhas de células tumorais, sendo respectivamente, (59,5%) em células tumorais de leucemia promielocítica aguda, (46,5%) no carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano, (26,7%) em carcinoma de laringe humano e (21,7%) nas células de adenocarcinoma de mama humano.

O extrato etanólico do Croton heliotropiifolius foi capaz de inibir a acetilcolinesterase (AChE), enzima de interesse no tratamento do Alzheimer (QUEIROZ et al., 2014), o que pode ser esclarecido pela presença da taspina.

Alguns estudos do óleo essencial de *C. heliotropiifolius* demonstraram que este apresentou efeito antibacteriano (ARAÚJO et al., 2017), larvicida (DIAS e MORAES, 2014) e o extrato etanólico confirmou atividade inseticida significativa contra *Sitophilus zeamais* (SILVA et al., 2012).

Filho e colaboradores (2017) realizaram o primeiro estudo da variação da composição química do óleo essencial de *Croton heliotropiifolius* nas quatro estações do ano e atividade antibacteriana. A pesquisa demonstrou que o principal constituinte do óleo essencial das folhas dessa espécie era o β-cariofileno e em todas as análises, observou-se que a amostra de óleo essencial coletada no verão se destaca das demais estações, apresentando maior atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Análises com os extratos botânicos de *C. heliotrpiifolius* resultaram na comprovação de ação antioxidante atribuída, provavelmente, pela presença de compostos fenólicos identificados na investigação fitoquímica de extrato etanólico da planta, principalmente taninos e flavonóides (RODRIGUES et al., 2010).

A infusão de raízes (imersa em água) de *C. heliotropiifolius* tem sido utilizada na medicina popular para tratamento da gripe, dor geral, inflamação e dermatite (SARAIVA et al., 2015), as folhas e casca são usadas como infusões ou pílulas para perda de peso e distúrbios gastrointestinais (QUEIROZ et al., 2014).

Segundo Silva et al., (2012) tendo por base testes in vivo o óleo essencial de *C. heliotropiifolius* foi capaz de reduzir edemas provocados por dextrana nas patas e orelhas de camundongos, demonstrando potencial anti-inflamatório, as doses usadas no experimento foram 50, 100, 200 mg/v.o, e a redução do edema chegou 48,6%.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desta forma, a ação farmacológica das plantas se deve a de seus metabolitos secundários sendo de grande importância para o benefício e equilíbrio homeostático do vegetal. As plantas medicinais além de outorgar um tratamento efetivo e natural, traz também a vantagem de ser uma terapia de baixo custo e fácil acesso podendo ser cultivadas em hortas residenciais, quintais, sítios e até mesmo ser encontradas em feiras livres e lojas especializadas. *C. heliotropiifolius* pode ser encontrada com frequência na vegetação da Caatinga, mas também ocorre em brejos, restingas e cerrados. Com base na medicina popular, a espécie vem sendo utilizada para dor de estômago, mal estar gástrico, vômitos, disenteria e como antipirético.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA J. R. G. S, RAMALHO A. C. M., SILVEIRA F. G. *Croton zehntneri* Pax & K. Hoffm (Euphorbiaceae). In: Albuquerque U., Patil U., Máthé Á. (eds) Medicinal and Aromatic Plants of South America. Medicinal and Aromatic Plants of the World, vol 5. Springer, Dordrecht, 2018.

ARRAIS, L. G. et al. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de Croton pulegioides Baill.(Zabelê). **Rev. bras. plantas med**, v. 16, n. 2, supl. 1, p. 316-322, 2014.

ARAÚJO, F. M. et al. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of Croton heliotropiifolius Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. **Industrial crops and products**, v. 105, p. 203-206, 2017.

ATHIÊ-SOUZA, S. M et al. Phanerogamic flora of the Catimbau National Park, Pernambuco, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 19, n. 1, 2019.

BARRERA, C. et al. Importancia medicinal del género Croton (Euphorbiaceae). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 2, p. 234-247, 2016.

BOTELHO, L. L. R.; DE ALMEIDA CUNHA, C.C.; MACEDO, M. O Método da Revisão Integrativa Nos Estudos Organizacionais. **Gestão e Sociedade**, Belo Horizonte, v. 5, n. 11, p. 121-136, 2011.

CANUTO, K. M., SILVEIRA, E. R., BEZERRA, A. M. E. Estudo fitoquímico de espécimens cultivados de cumaru (Amburana cearensis AC Smith). **Química Nova**, 33(3), 662-666,2010.

CARUZO, M. B. R.; PEREIRA, A. P. N.; CORDEIRO, I. Croton (Euphorbiaceae) in the State of São Paulo, Brazil: an update. **Hoehnea**, v. 46, n. 1, 2019.

COSTA, J. L .C.; SECCO, R. S.; GURGEL, E. S. C. Flora of the canga of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Euphorbiaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 1, p. 59-75, 2018.

CREPALDI, C. G. et al. Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 157-165, 2016.

DA SILVA, W. A. et al. Perfil fitoquímico e avaliação toxicológica Croton Heliotropiifolius frente à Artemia Salina Leach. **Brazilian Journal of health review**, v. 3, n. 4, p. 10580-10590, 2020.

DRUMOND, A. A. L. et al. Qualidade fisiológica de sementes de mamona (*Ricinus communis L.*) após o beneficiamento. **Journal of Seed Science**, v. 41, n. 2, p. 224-232, 2019.

FILHO, J. M. T. A et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of Croton heliotropiifolius in different seasons of the year. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 4, p. 440-444, 2017.

LAU, N. S. et al. The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis. **Scientific reports**, v. 6, p. 28594, 2016.

OLIVEIRA, Douglas Dourado et al. Fixed and volatile constituents of Croton heliotropiifolius Kunth from Bahia-Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 26, p. 540-545, 2016.

OSATHANUNKUL, M et al. Refining DNA barcoding coupled high resolution melting for discrimination of 12 closely related croton species. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0138888, 2015.

QUEIROZ, M. M. F. et al. Antifungals and acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of Croton heliotropiifolius. **Phytochemistry Letters**, v. 10, 2014.

RODRIGUES, K. A. D. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. D. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. Prospecção Fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de Momordica charantia l. **Cadernos de Pesquisa**, 17(2), 2010.

RODRIGUES, O. G. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de Croton Heliotrpiifolius Kunth. e Croton blanchetianus Baill. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2017.

SANGHA, R. B.; GAYATRI, M. C. Ethanomedicinal properties of Euphorbiaceae family-a comprehensive review. **International Journal of Phytmedicine**, v. 6, n. 2, p. 144-156, 2014.

SANTOS, R. F.; RIINA, R.; CARUZO, M. B. R. Croton sapiifolius Müll. Arg. In: a new occurrence for the State of Espírito Santo, Brazil. **Hoehnea**, v. 43, n. 4, p. 529-531, 2016.

SILVA, J. A. G et al. Physicochemical characteristics and cytotoxic effect of the methanolic extract of Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 28, p. 321-326, 2017a.

SILVA, J. A. G. et al. Screening Fitoquímico e Avaliação da Toxicidade de Croton heliotropiifolius Kunth (Euphorbiacea) frente à Artemia salina Leach. **Rev. Virtual Quim.** Vol 9, n. 3, 934-941. 2017b.

SILVA, L.B et al. Toxicidade do extrato etanólico de Croton heliotropiifolius em populações de gorgulho de grãos de milho armazenados. **J. Entomol**. 6: 413-421, 2012.

SODRÉ, R. C.; DA SILVA, M. J. O gênero Croton L.(Euphorbiaceae ss–Crotonoideae) na Floresta Nacional de Silvânia, Goiás, Brasil. **Iheringia Série Botânica**. v. 70, n. 1, p. 89-104, 2015.

TRINDADE, MJ de S.; LAMEIRA, O. A. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164–175, 2013.

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO NA FEIRA DA MANAUS MODERNA

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 16/12/2021

Gabriel José da Silva Serra
Mestrando em Genética, Conservação e Biologia evolutiva. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Manaus- Am
http://lattes.cnpq.br/2588717649612002

Caroline Sobrinho Barros
Bacharel em Ciências Biológicas. Faculdade Estácio do Amazonas
Manaus-Am
http://lattes.cnpq.br/0583590035325158

Gisele Macedo Souza
Bacharel em Ciências Biológicas. Faculdade Estácio do Amazonas
Manaus-Am
http://lattes.cpq.br/8305203607922777

Hudson Batista da Costa
Bacharel em Ciências Biológicas. Faculdade Estácio do Amazonas
Manaus-Am
http://lattes.cnpq.br/6919812937547654

Ricardo Felipe de Souza Caramês
Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas. Faculdade Estácio do Amazonas
Manaus-Am
http://lattes.cnpq.br/9164350342712957

RESUMO: O queijo de coalho vem há muitos anos ocupando lugar de destaque na mesa dos consumidores brasileiros, principalmente na região Nordeste e Norte, devido ao seu alto valor nutritivo e sabor agradável, sendo utilizado em inúmeros pratos da gastronomia nordestina e norte. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade microbiológica comercializado em uma feira livre do município de Manaus-Am visando buscar patógenos causadores de doenças que afetam a população de Manaus. Foram coletadas dez amostras do queijo coalho, durante o mês de março do ano de dois mil e dezoito, em três pontos de vendas da Manaus Moderna. De acordo com os resultados, os valores obtidos para coliformes totais foram considerados elevados para quase todas as amostras analisadas. Quanto aos patogênicos, 100% das amostras apresentaram contagem *Salmonella sp* e *E.coli.* Por meio dos resultados, pode-se concluir que estes produtos estão sendo fabricada sem a adoção das boas práticas de fabricação e numa condição que compromete a qualidade do produto e que põe em risco a saúde do consumidor.

PALAVRAS-CHAVE: Derivado do Leite. Segurança alimentar. Microbiologia.

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF COALHO CHEESE SOLD AT THE MANAUS MODERNA FAIR

ABSTRACT: For many years, coalho cheese has been occupying a prominent place on the table of Brazilian consumers, mainly in the Northeast and North regions, due to its high nutritional value and pleasant flavor, being used in numerous dishes of northeastern and northern gastronomy. This study aims to evaluate the microbiological quality

sold in an open market in the city of Manaus-Am, aiming to search for pathogens that cause diseases that affect the population of Manaus. Ten samples of coalho cheese were collected during the month of March of the year two thousand and eighteen, in three points of sale of Manaus Moderna. According to the results, the values obtained for total coliforms were considered high for almost all analyzed samples. As for pathogens, 100% of the samples had *Salmonella sp* and *E.coli sp* counts. Through the results, it can be concluded that these products are being manufactured without the adoption of good manufacturing practices and in a condition that compromises the quality of the product and puts the consumer's health at risk.
KEYWORDS: Dairies. Food safety. Microbiology.

1 I INTRODUÇÃO GERAL

A bactéria Salmonella é uma doença zoonótica de grande importância para a saúde pública (Korsak et al., 2004). Existem duas subespécies de Salmonella: Salmonella, que é isolada de animais de sangue frio; Temos Salmonella intestinal, que contém mais de 2.579 sorotipos. Entre eles, 1.531 pertencem à subespécie intestinal (Grimont et al. 2007), incluindo os sorotipos: *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que causam leucoplasia específica de aves e tifo aviário (Gast et al. 2008). Os principais vetores de disseminação são alimentos de origem animal, principalmente aves e ovos, mas o projeto também inclui carne bovina, peixes, frutos do mar, laticínios, como leite e queijo de leite não pasteurizado e sorvete (Shinohara et al., 2008). Portanto, qualquer alimento desses animais ou qualquer alimento em contato com suas fezes pode ser considerado um meio de transmissão de *Salmonella*. A presença de Salmonella nos queijos coalhos em alguns estudos (Florentino et al. 1999, Nassu et al. 2001, Pinto et al. 1996) foram relatados, os quais enfatizaram o controle de qualidade microbiológica do produto é importante porque a legislação brasileira (Brasil, 2003) estipula que este tipo de bactéria não existe em alimentos. Este gênero pertence à família Enterobacteriaceae e inclui bacilos Gram-negativos que não produzem esporos; anaeróbios facultativos móveis devido à presença de flagelos periféricos ou flagelos imóveis; produzem ácido e gás a partir de glicose e outros carboidratos (Franco et al. 2005). Eles são oxidase negativos e catalase positivos (com muitas poucas exceções) e pode usar citrato como única fonte de carbono (Franco et al. 2005)

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa gram-negativa pertencente á microbiota intestinal dos animais, incluso o homem, e estão localizados no ceco e colón (Tenaillon et al., 2010). Pode ser encontrada abundantemente na microbiota de diversos animais, exige grande interação dessa bactéria com o hospedeiro (Croxen et al. 2010). Estudos diversos ainda estão sendo realizados para maior compreensão dessa bactéria na microbiota, mas sabe-se que auxilia no processo de absorção de vitaminas ao ocupar locais na mucosa intestinal, bloqueando a fixação de bactérias patogênicas (Ferreira et al. 2009). Embora tenham uma relação simbiótica com humanos, essas bactérias apresentam características de virulência diferentes e são divididas em tipos patogênicos diarreicos e

extraintestinais (Croxen et al. 2010). Além das infecções gastrointestinais, a *E. coli* também pode causar infecções do trato urinário (Croxen et al. 2010).

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem á família da *Aspergillaceae,* a classe dos *Ascomicetos* e a subclasse *Euascomycetae.* Existem mais de 200 espécies dentro deste gênero, mas apenas cerca de 20 tem sido encontrada como causa de doença (Richardson & Warnock, 2003). *Aspergillus fumigatus* é o agente etiológico responsável por aproximadamente 90% das aspergiloses invasivas diagnosticadas (Araujo et al., 2005a). Porém, outras espécies, incluindo *Aspergillus flavos*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus Níger* e *Aspergillus termos* são as principais responsáveis pelas restantes infecções (Jiang et al, 2013, Martins et al. 2005, Murray et al. 2006). A aspergilose é uma infecção fúngica oportunista, primariamente respiratória, causada por fungos do gênero *Aspergillus (Flach et al. 1988).* Este gênero caracteriza-se por fungos filamentosos com hifas hialinas, septadas e ramificadas em ângulo agudo, as quais se diferenciam em estruturas reprodutivas típicas para dar origem aos conídios (Parks, 2009).

O gênero *Penicillium* é caracterizado pela produção de conídios em cadeias a partir de verticilos das fiálides (Pitt et al. 2000). A taxonomia de *Penicillium* foi, inicialmente, baseada na forma da fiálide e ramificação dos conidióforos, sendo o gênero dividido em 10 seções e 18 séries (Houbraken et al. 2011). Pitt (2000) classificou as espécies monoverticiladas de *Penicilium* no subgênero Aspergilloides, as espécies biverticiladas foram classificadas no subgênero *Furcatum*. As espécies biverticiladas, que demonstravam um arranjo regular, com as metilas localizadas, terminalmente, à estirpe, foram classificadas no subgênero *Biverticillium*. Por contágio, contaminam frutas e sementes e chegam a invadir habitações, sendo responsáveis pelos bolores que se instalam em alimentos para consumo humano (Houbraken et al. 2011). Alguns membros do gênero produzem penicilina, uma molécula usada como antibiótico, que mata ou impede o crescimento de certos tipos de bactérias. Outras espécies são usadas na fabricação de queijos (Houbraken et al. 2011).. De acordo com o *Dictionary of the Fungi* (10ª edição, 2008), o gênero generalizado contém mais de 300 espécies (Kirk et al. 2005).

No estado do Amazonas, os queijos coalho artesanais são fabricados para comercialização principalmente no município de Manaus. Em diversas regiões, a produção de queijos artesanais envolve peculiaridades técnicas que os assemelha ou diferencia. Embora a legislação que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (RIISPOA) estabeleça que o leite a ser utilizado deva ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente ainda é encontrado queijo de coalho produzido com leite cru (Brasil, 2001). Durante o processo de produção do queijo não deve ocorrer contaminação. Para identificar possíveis falhas higiênicas, que possa causar contaminação do alimento, busca-se a investigação de presença de microrganismos indicadores de má qualidade higiênica e de microrganismos patogênicos (Salloti et al.,2006).

Sabe-se que o queijo coalho é um produto popular da região Norte e Nordeste sendo produzido de forma artesanal como de forma industrial. É bastante consumido pelos manauaras, apresentando relevância socioeconômica e cultural (Dantas et al., 2013). O presente trabalho tem como objetivo realizar analise microbiológicas no queijo coalho artesanais comercializado em Manaus-Am visando buscar patógenos causadores de doenças que afetam a população.

2 | OBJETIVOS

Geral

Realizar analises laboratoriais dos queijos coletados na feira da Manaus Moderna buscando a qualidade microbiológicas dos queijos tipo coalho, visando buscar patógenos causadores de doença.

Específicos

- Analisar a qualidade microbiologica do queijo tipo coalho encontrado na feira, verificando a existência de *Salmonella sp* e *E. coli sp*.
- Analisar a possibilidade de fungos do tipo *Aspergillus sp* e *Penincilium sp.*
- Correlacionar à qualidade microbiologica do queijo comercializado na feira com o aparecimento de doenças.

3 | MATERIAL E MÉTODOS

As analises microbiológicas foram realizadas no laboratório de micologia da Faculdade Estácio do Amazonas e conforme as normas do comitê de ética da pesquisa da instituição.

3.1 Delineamento amostral

Foram analisadas 10 amostras de queijo coalho, adquirida na Feira livre da Manaus Moderna da cidade de Manaus, no mês de março de 2018 (Figura. 1). As amostras foram coletadas com assepsia em sua embalagem plástica original e transportadas sob-refrigeração em caixas de isopor com gelo artificial. Todos os procedimentos utilizados no preparo das amostras seguiram as recomendações descritas no Compedium of methods for the microbiologica Examination of Foods. As embalagens foram desinfetadas com álcool 70% e abertas com tesoura esterilizadas. O queijo foi todo picado em uma placa de petri estéril com auxilio de uma faca e colher esterilizadas. Estas amostras foram maceradas em capsulas de porcelana com auxilio de pistilo para obter uma maior homogeneização. Foi retirado 25g de cada amostra e colocadas no erlenmeyer contendo 225 mL de

água peptonada estéril, homonogeizou-se por 2 min a amostra. A segunda e a terceira serie continham 9 mL de água peptonada e receberam 1 mL de diluições 10 -1 e 10-2, respectivamente (Silva et al.,2007).



Figura 1: Feira da Manaus Moderna. Foto: G1 Amazonas.

3.2 Analises Microbiológicas

3.2.1 Técnica de tubos múltiplos

Após selecionar as dez diluições inocularam-se 1 mL da diluição em uma série de dez tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Os tubos LST foram incubados a 35º C por 24 horas e observou-se o crescimento com produção de gás. Em caso positivo, transferiu-se uma alçada em tubo contendo nove mL de Verde Bile Brilhante (VB) e outra alçada em cinco mL de caldo *E.coli* Médium (EC) (MERCK 10765). Os tubos VB foram incubados a 35ºC por 24 horas e determinou–se o número de tubos positivos com gás para confirmação de coliformes a 35ºC. Já os tubos EC foram incubados a 45ºC em banho-maria por 24 horas para confirmação da presença de coliformes a 45ºC (SILVA et al., 2007). De cada tubo de EC positivo com produção de gás, estriou-se uma alçada em placa contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) sendo as mesmas incubadas a 35º C por 24 horas, e posteriormente foi observado se houve desenvolvimento de colônias nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico. Havendo colônias típicas, foram transferidas 10 colônias bem isoladas em tubo contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) inoculando a 35º C por 24 horas.

3.2.2 *Técnica de aglutinação em lamina*

Para a técnica de aglutinação em lâmina, utilizou-se lâmina limpa e desengordurada com álcool. A suspensão bacteriana usada era suficientemente espessa onde se suspendeu o crescimento da superfície do meio 2x LB em 0,2 a 0,3 ml de solução salina. A proporção suspensão/antissoro era de uma alçada para uma gota normal dos soros PROBAC, seguindo a técnica utilizada por Ávila et al. (1988). A mistura suspensão/antissoro foi totalmente homogênea e ocupou uma área de 1,5 cm de diâmetro. Movimentando a lâmina de modo que a mistura suspensão/antissoro se desloque fácil e continuamente. A movimentação foi mantida pelo menos por 1 a 2 minutos.

3.2.3 *Pesquisa de Salmonella sp*

Após a retirada das alíquotas para as demais análises microbiológicas, o restante foi utilizado para a etapa de pré-enriquecimento da amostra. O pré-enriquecimento foi feito com incubação das amostras preparadas a 36±1 ºC por 16 a 20 horas. Após o procedimento de pré-enriquecimento, foram inoculados os caldos seletivos Rappaport Vassiliadis (RV), 0,1 mL em tubos contendo 10 mL, e Selenito-cistina (SC), 1 mL em 10 mL de caldo, ambos incubados a 41± 0,5 ºC em banho-maria por 24 a 30 horas. A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, a superfície de placas contendo Ágar Verde Brilhante (VB) e Ágar Xilose, Lisina, Desoxicolato (XLD) foram inoculadas estriando de forma a se obter colônias isoladas. Foram selecionadas de três a cinco colônias suspeitas de Salmonella spp., repicadas em ágar não seletivo e incubadas a 36 ºC por 18 a 24 horas a fim de verificar a sua pureza. Em condições assépticas dispensar em placas de petri e deixar solidificar o meio com as tampas das placas parcialmente removidas.

3.2.4 *Pesquisa de Aspergillus sp e Penincilium sp*

Para a presença dos respectivos fungos foi pesado 32,5g do meio em 500 mL de água destilada. Após isso foi aquecido, aquecido frequentemente e fervido por 1 min no agitador magnético para dissolver completamente o meio. Em seguida foi levada para autoclave por 15 min a 121ºC. Após umas horas foi distribuída nas respectivas placas de petri e aguardou solidifica-la. Após a solidificação foram guardadas na estufa bacteriológica á 36ºC.

3.2.5 *Analise microbiologica de Coliformes Fecais*

Para contagem de coliformes fecais foi pesado 8,75 g do meio em 250 mL de água purificada. Em seguida foi misturado completamente e colocado por alguns minutos no agitador magnético para homogeneizar. Em seguida foi pra autoclave por 15min á 121 ºC. Após ter ficado na autoclave por algumas horas, foi distribuído nos respectivos tubos contendo o tubo de Durham de fermentação invertida.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as analises microbiológicas tivemos presença total de bactérias e fungos nas amostras estudadas. Das dez amostras de queijos analisadas, 100% foram confirmadas o crescimento de *Salmonella sp,* indicando a falta de um controle rígido de higiene dos manipuladores e o descaso com as Boas Prática de Manipulação (BPM) durante a preparação desses alimentos (Fig. 2). Duarte et al. (2005) detectaram presença desta bactéria em 5,5% das amostras de queijos coletadas em estabelecimentos comerciais. Segundo Ávila e Gallo (1996), os produtos de laticínios são uns dos mais importantes veículos de transmissão de *Salmonella sp.*, e o consumo de queijo de coalho contaminado por esta bactéria pode representar risco à saúde da população manauara visto que este é um alimento típico e acessível à maioria das classes sociais do Nordeste (Duarte et al., 2005).



Figura 2: 100% de *Salmonela sp.* Foto: Caroline Barros.

Nadvorny et al. (2004), avaliando a ocorrência de DTA no Rio Grande do Sul, constataram que 74,7% dos surtos ocorridos no ano 2000 foram ocasionados por *Salmonella sp.* e que a utilização de matéria-prima sem inspeção sanitária e a manipulação incorreta

dos alimentos constituíram-se nos fatores predisponentes à contaminação dos alimentos. Percentual superior foi encontrado por Borges et al. (2003), que constataram a presença deste micro-organismo em 34,9% da amostra de queijos de coalho produzidos no Estado do Ceará. A legislação brasileira (Brasil, 2001a) não permite a presença desta bactéria em alimentos.

Com relação a coliformes fecais, as dez amostras apresentaram e confirmaram 100% de *Escherichia coli* (Figura 3), entretanto nenhuma delas (0%) estava em desacordo com o padrão estabelecido na legislação brasileira e então foram classificadas como “produtos em condições sanitárias satisfatórias”, e, portanto, “produtos de acordo com padrões legais vigentes”. Esta conclusão contradiz aquelas encontradas nos trabalhos realizados por Oliveira et al. (1998), Sá Barreto & Pereira (1999), Peresi et al. (2001), Silva et al. (2001), Vieira et al. (2001b.), Almeida Filho & Nader Filho (2002) e Hoffmann, Silva & Vinturim (2002). A presença dos coliformes fecais com ênfase na *Escherichia coli*, tem sido relatada no leite que é usado para produção de queijos. Por serem bactérias termossensíveis, suas presenças no leite pasteurizado indicarão contaminação posterior à pasteurização ou então pasteurização deficiente (Vessoni et al. 1986).

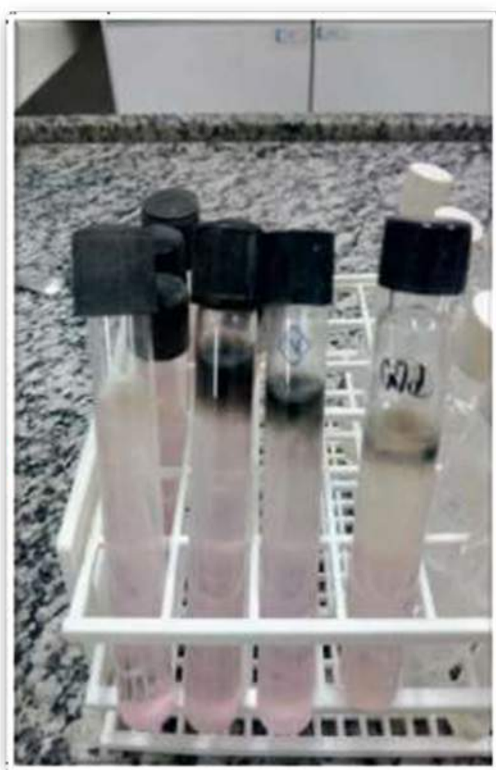


Figura 3: 100% de *E.coli*. Foto: Gabriel José.

A presença de bolores e leveduras em queijos é, na maioria dos casos, indesejável. Quanto maiores as contagens desta classe de deteriorantes, maiores são as deficiências de higiene na planta de processamento. Há, contudo, bolores e leveduras que são úteis na fabricação de alguns tipos de queijos. Os bolores mais comuns encontrados em queijos embalados a vácuo são Penicilium spp. (especialmente P commune, um fungo azul) e C1adosporium spp. (especialmente C. cadosporioides, um fungo preto). Outros bolores encontrados em diferentes queijos são Aspergilus, Fusarium, Muco, Scopulariopsis e Verticillium.

Com relação à presença de fungos obtivemos 100% de *Aspergillus sp* e *Penincilium sp.* Embora *Aspergillus sp* e *Penincilium sp* (Figura 4 e 5) sejam os fungos dominantes isolados do ar de plantas processadoras de queijos, os *Penicillium spp* são os que dominam entre os fungos isolados dos queijos, havendo baixos níveis de Aspergillus presentes (Johnson,2001). O ambiente das câmaras de maturação de queijos favorece a multiplicação fúngica devido às condições de temperatura e umidade (Pinto et al. 2007). Os fungos fazem parte da microbiota normal das câmaras de maturação de queijos e, neste ambiente, se tornam indesejáveis, pois provoca alterações sensoriais, desclassificação dos produtos e defeitos, levando a perdas econômicas. Os bolores do gênero Penicillium parecem ser os tipos dominantes crescendo na superfície de queijos. Penicilium comum e é o mais frequente nos fungos encontrados em todos os tipos de queijos.

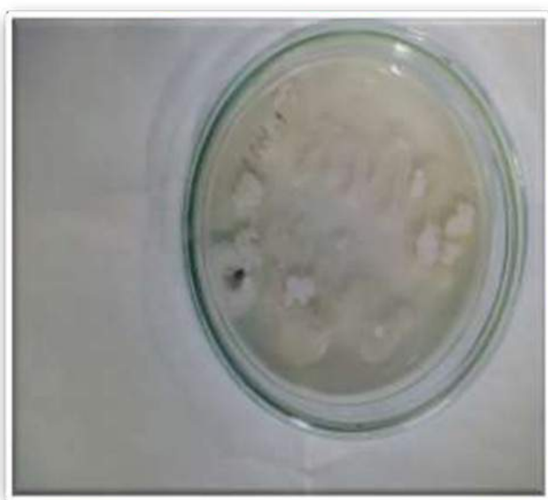


Figura 4: 100% de *Aspergillus sp*. Foto: Gisele Macedo.



Figura 5: 100% de *Penincilium sp.* Foto: Hudson Batista.

É importante salientar que esses micro-organismos não tem indicação, segundo a lei vigente, de limites toleráveis para queijo coalho, com isso é importante verificar, devido ao fato de estar intimamente relacionada á qualidade higiênico-sanitario dos alimentos. Pelo resultado obtido é importante obter ter estudos aprofundados e ter um controle mais rígido relacionado á fabricação, armazenamento, transporte e comercialização desses produtos nos estabelecimentos comerciais visitados. Estudos realizados por Santana et al. (2008), reafirmaram esse achado. Os autores atribuem essas informações por conta da falta de higienização nas etapas de produção do queijo.

5 I CONCLUSÃO

Portanto podemos concluir neste estudo algumas considerações que podem ajudar em próximos trabalhos, tais como:

- A analise microbiologica mostrou um elevadíssimo crescimento de bactérias e fungos nos queijos coalhos, levando-nos á concluir que eles estão sendo produzidos sem a adoção das boas praticas de produção (BPF), no qual coloca em risco a qualidade do produto e põe em risco á saúde do consumidor.
- É necessária uma fiscalização desse produto por parte da FVS, e uma conscientização dos próprios produtores e feirantes, para que seja evitado um dano maior ao bem estar da população nas feiras dos municípios.
- A maioria dos queijos de coalho comercializados na Feira da Manaus Moderna no Estado do Amazonas, Brasil, apresenta-se em desacordo com os padrões

microbiológicos vigentes na legislação brasileira, sendo considerada imprópria para o consumo humano.

REFERÊNCIAS

Ávila, C. R.; Gallo, C. R. **Pesquisa de *Salmonella sp.* em leite cru, leite pasteurizado tipo "C" e queijo minas frescal comercializado no município de Piracicaba-SP**. Scientia Agrícola, v. 53, n. 1, p. 234-239, 1996.

Almeida Filho, E. S.; Nader Filho, A. **Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo "Minas Frescal" de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas-MG**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 16, n. 102/103, p. 71-73, nov./dez., 2002.

Araujo, R., Pina-Vaz, C. e Rodrigues, A. G. (2005a). **Surveillance of airborne Aspergillus in a Portuguese University Hospital**, Mycoses, 48(2), pp. 45.

Brasil. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Manteiga do Queijo de Coalho. RIISPOA.

Borges, M.F.; Feitosa, T.; Nassu, R.T.; Muniz, C.R.; Azevedo, E.H.F.; Figueiredo, E.A.T. **Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil.** Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v.21, n.1, p.31- 40, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, 2003. p.14-51.

Croxen, M.A.; Finlay, **BB Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity**. Nature Review Microbiology, v.8, p.26-38, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2265.

Duarte, D. A. M. et al. **Pesquisa de Listeria monocytogenes e micro-organismos indicadores higiênicos-sanititários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco.** Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005

Dantas, D. S., Araújo, A. M., Santos, J. O., Santos, M. S., Rodrigues, O. G. **Qualidade Microbiológica do Queijo de Coalho Comercializado no Município de Patos**, Estado da Paraíba. ACSA – Agropecuária Cientifica no Semiárido, 2013, v. 9, n. 3, p. 110-118.

Flach EJ, Stevenson MF, Henderson GM. **Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo**, 1964 to 1988. Veterinary Record. 1990;126:81-85

Florentino, E. S.; Martins, R. S. **Características microbiológicas do "queijo de coalho" produzido no estado da Paraíba.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, 1999.

Ferreira, A.J.P.; Knöbl, T. Colibacilose. In: Berchieri Jr., A.; Silva, E.; Di Fábio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M.A.F. (Horas.). **Doença das aves**. 2th.ed. Campinas: Facta, 2009. chapa.4.2, p.457-500.

Franco, B. D. G. M.; Langraf, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p

Grimont, P.A.D.; Weill, F.X. **Antigênica fórmula of tem Salmonella serovars. In: World Health Organization (WHO).** Collaborating Centre for Referência and Research on Salmonella. 9th.ed. Paris: WHO/Institut Pasteur, 2007.

Gast, R.K. *Salmonella* infections. In: Calnek, B.W.; Barnes, H.J. Beard, C.W.; Mcdougald, L.R.; SAIF, Y.M. Desases of poultry. 12th.ed. Ames: EUA University, 2008. chapa.16, p.619-665.

Hoffmann, F. L.; Silva, J. V.; Vinturim, T. M. **Qualidade microbiológica de queijos tipo "Minas Frescal", vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto-SP**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 69-76, mai., 2002.

Houbraken, J.; Samson, R. A. **Phylogeny of Penicillium and the segregation of Trichocomaceae into three families. Studies in Mycology** 70: 1–51, 2011.

Johnson, M.E. Cheese Products (capítulo 11). In: Marth, E.H.;Steele, J.L.Applied Dairy Microbiology. Nova lorque: Mareei Dekker. 2001.

Jiang, Z., Wang, Y., Jiang, Y., Xu, Y. e Meng, B. (2013). **Vertebral osteomyelitis and epidural abscess due to Aspergillus nidulans resulting in spinal cord compression: Case report and literature** review, Journal of International Medical Research, 41(2), pp.502–510.

Korsak, N.; Clinquart, A.; DAUBE, G. ***Salmonella sp*. das les déreis alimenta ires d'origem anima Le: un. real problema de santo publique?** Annals de Medicine Véterinaire, v.148, n.4, p.174-193, 2004.

Kirk, PM; Cannon, PF; Minter, DW; Stalpers, JA (2008). **Dictionary of the Fungi** 10th ed. Wallingford, UK: CABI. p. 505. ISBN 978-0-85199-826-8

Nassu, R.T.; Lima, J.R; Bastos, M.S.R.; Macedo, B.A.; Lima, M.H.P. **Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará**. Higiene alimentar, São Paulo, v.15, n.89, p.28-36, 2001.

Nadvorny, A.; Figueiredo, D.M.S.; Schmidt, V. **Ocorrência de Salmonella sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000**. Acta Scientiae Veterinariae, v.32, n.1, p.47-51, 2004.

Oliveira, C. A. F.; Moreno, J. F. G.; Mestieri, L.; Germano, P. M. L. **Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 31- 35, mai./ jun., 1998.

Pitt, J. I. **Toxigenic fungi: which are important**. Medical Mycology, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000

Peresi, J. T. M.; Graciano, R. A. S.; Almeida, I. A. Z. C.; Lima, S. I.; Ribeiro, A. K.; Carvalho, I. S.; Lima, M. Queijo Minas Frescal artesanal e industrial: **Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 63-70, abr., 2001.

Pinto, A.T; Schmidt, V.; Raimundo, SA; Raihmer, F. **Uso de ozónio no controle de fungos em sala de maturação de queijos**. Acta Scientiae Veterinariae. 35(3): 333-337, 2007.

Park S, Mehrad B. **Innate immunity to *Aspergillus* species**. Clinical Microbiology Reviews. 2009;22:535-551.

Richardson, M. D. e Warnock, D. W. (2003). **Fungal Infection Diagnosis and Management**, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd.

Sá Barreto, E. S.; Pereira, C. R. P. **Avaliação da qualidade das marcas de queijo minas tipo frescal consumidas no município do Rio de Janeiro**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 53, abr./ mai., 1999.

Salotti, B.M., Carvalho, A.C.F.B., Amaral, L.A., Vidal-Martins, A.M.C., Cortez, A.L. **Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil**. Arquivos do Instituto Biológico, 2006, v.73, p.171-175.

Silva, Junqueira, V.C.A; Silveira, N.F.A; Taniwaki, M.H.; Santos, R.F.S.dos; Gomes, R.A.R. **Manual de métodos de analise microbiologica**. 3 ed. São Paulo. Livraria Varela, 2007. 552p.

Shinohara, N. K. S. et al. **Samonella spp., importante agente patógeno veiculado em alimentos.** Revista Ciências & Saúde Coletiva, v. 13, n. 5, p. 1675-1683. 2008.

Santana, R. F. et al. **Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Minas Gerais, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008

Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. **The population genética of com mensal Escherichia coli.** Nature Review Microbiology, v.8, p.207-217, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2298.

Vessoni Penna, T. C.; Baruffaldi, R.; Colombo, A. J. **Estudo das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado, teor de gordura 3,2% m / v., vendido na cidade de São Paulo**. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 6, n. 1, p. 57-74, 1986.

Vieira, M. C. M.; André, M. C. D. P. B.; Serafini, A. B.; Lima, S. V.; Silva, E. V. **Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C, comercializado no Estado de Goiás no período de janeiro a junho de 2000**. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 72, mar., 2001a.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO POR CITOMETRIA DE FLUXO E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS SECRETADOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Data de aceite: 01/02/2022

Data de submissão: 31/01/2022

Caio Lopes Borges Andrade
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/3027186212966797

Lília Ferreira de Moura Costa
Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/6672994596587713

Ramon Mendes dos Santos
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/2239694896220013

Rogério Reis Conceição
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/1968670876252647

Luiz Gustavo Freitas Oliveira
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/7157916155037746

Allan Souza dos Santos
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/1583877522354653

Mariane Melo dos Santos
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/3314656742166798

Alex José Leite Torres
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/7288089475019880

Maria da Conceição Aquino de Sá
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/4867004601756729

Fulvia Soares Campos de Sousa
Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia (LAMABI) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/0611165561750495

Marcos Borges Ribeiro
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/7634265862645053

Roberto José Meyer Nascimento
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/9574426480028427

Songeli Menezes Freire
Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LABIMUNO) - Instituto de Ciências da Saúde (ICS) - Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil.
Salvador - Bahia
http://lattes.cnpq.br/8634866589762862

RESUMO: Introdução: *Corynebacterium pseudotuberculosis, é o patógeno* responsável pela Linfadenite Caseosa (LC) que é uma doença infecto-contagiosa que compromete economicamente a pecuária. A infecção em humano ocorre pelo manejo de animais, consumo de seus derivados crus ou em laboratórios, com poucos casos descritos e apenas um estudo no Brasil. A identificação bacteriana proveniente do conteúdo caseoso, seguido por testes bioquímicos constitui atualmente o teste padrão ouro de diagnóstico. **Objetivo:** O presente trabalho se propõe a avaliar e comparar o crescimento bacteriano e a produção de antígenos para avaliação da sororreatividade humana de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Métodos:** Para contagem bacteriana e estudo da viabilidade celular em FACSCalibur (BD) foram realizados cultivos da cepa VD57 para os três tempos (24, 48, 72 horas) e comparação com cepas CAP3W(21) e CAPJ4(76) em 24 e 48 horas. Para produção do antígeno, foi utilizado o sobrenadante do cultivo com 48 horas das cepas VD57, CAP3W(21) e CAPJ4(76), semi-purificados por técnica de partição em três fases (TPP). Foi produzido extrato em meio com e sem Tween-80 somente para cepa CAPJ4(76). O perfil eletroforético dos quatro extratos foi analisado por SDS-PAGE em gel 12% e a sororreatividade avaliada em Western Blot com *pool* de amostras séricas do grupo Não Contactante (composto por 4 participantes sem histórico de contato com a bactéria ou consumo de carne crua ou mal cozida), grupo Contactante laboratório (composto por 4 indivíduos com histórico de contato por atividade em laboratório de microbiologia) e grupo Contactante fazenda (composto por 4 indivíduos com histórico de contato com animais infectados). **Resultados:** Na avaliação por FACs, evidenciou-se crescimento celular mais acelerado para cepa VD57 com resultado

10 vezes superior ao registrado por CAP3W(21) e CAPJ4(76). O ápice da viabilidade celular registrado foi de 48 horas, porém não foi identificada variação considerável da mortalidade celular com 72 horas. O perfil eletroforético dos extratos produzidos revelou diferenças na expressão de proteínas entre as três cepas, bem como para cultivos em condições diferentes para CAPJ4(76). Foi registrada intensa sororreatividade humana aos quatro extratos, confirmando a presença de proteínas antigênicas em todas as cepas, porém foi possível identificar diferença no perfil de reconhecimento entre os grupos Contactantes e Não Contactantes apenas no extrato VD57. **Conclusão:** A cepa VD57 apresenta ápice do crescimento e viabilidade no tempo de 48 horas de cultivo e na comparação entre as três cepas, demonstra crescimento e viabilidade superiores ao das demais. O perfil eletroforético dos extratos de cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cultivadas sob mesmas condições, apresentam similaridade no número de bandas e diferença no peso molecular. A utilização de Tween-80 no meio de cultivo, gera um acréscimo de 50% no número de bandas para CAPJ4(76). Todos os extratos produzidos apresentam antigenicidade para soro humano, porém é possível evidenciar diferença no perfil de Contactantes do perfil de Não Contactantes apenas em VD57.
PALAVRAS-CHAVE: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Contagem Bacteriana; Sororreatividade Humana.

ABSTRACT: Introduction: *Corynebacterium pseudotuberculosis* is the pathogen responsible for Caseous Lymphadenitis (CL) which is an infectious disease that economically compromises livestock. Infection in humans occurs by handling animals, consumption of their raw derivatives or in laboratories, with few cases described and only one study in Brazil. Bacterial identification from caseous content, followed by biochemical tests, is currently the gold standard diagnostic test. Objective: The present work aims to evaluate and compare bacterial growth and antigen production for the evaluation of human seroreactivity of three strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Methods: For bacterial counts and cell viability studies in FACSCalibur (BD), cultures of the VD57 strain were performed for the three times (24, 48, 72 hours) and compared with CAP3W(21) and CAPJ4(76) strains in 24 and 48 hours. For antigen production, 48-hour culture supernatant of strains VD57, CAP3W(21) and CAPJ4(76), semi-purified by three-phase partition technique (TPP) was used. Extract was produced in medium with and without Tween-80 only for the CAPJ4 strain(76). The electrophoretic profile of the four extracts was analyzed by SDS-PAGE in 12% gel and the seroreactivity was evaluated by Western Blot with a pool of serum samples from the Non-Contacting group (composed of 4 participants with no history of contact with the bacteria or consumption of raw or undercooked), laboratory contact group (composed of 4 individuals with a history of contact due to activity in a microbiology laboratory) and farm contact group (composed of 4 individuals with a history of contact with infected animals). Results: In the evaluation by FACs, faster cell growth was observed for strain VD57, with a result 10 times higher than that recorded by CAP3W(21) and CAPJ4(76). The peak of cell viability recorded was 48 hours, but no considerable variation in cell mortality was identified at 72 hours. The electrophoretic profile of the extracts produced revealed differences in protein expression between the three strains, as well as for cultures under different conditions for CAPJ4(76). Intense human seroreactivity to the four extracts was recorded, confirming the presence of antigenic proteins in all strains, but it was possible

to identify a difference in the recognition profile between the Contacting and Non-Contacting groups only in the VD57 extract. Conclusion: The VD57 strain presents apex of growth and viability in the time of 48 hours of cultivation and in the comparison between the three strains, it demonstrates growth and viability superior to the others. The electrophoretic profile of extracts of *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains cultivated under the same conditions, show similarity in the number of bands and difference in molecular weight. The use of Tween-80 in the culture medium generates a 50% increase in the number of bands for CAPJ4(76). All extracts produced have antigenicity for human serum, however, it is possible to show a difference in the profile of Contacts from the profile of Non-Contactants only in VD57.
KEYWORDS: *Corynebacterium pseudotuberculosis*; Bacterial Count; Human Seroreactivity.

1 I INTRODUÇÃO

A ovino-caprinocultura correspondem a importantes setores da atividade pecuária. No mercado internacional destaca-se fortemente a produção de lã, no entanto a produção de carne e leite, consistem em uma vital fonte de renda para diversas famílias do nordeste e de outras regiões brasileiras, assim como de vários países em desenvolvimento (BOYAZOGLU, HATZIMINAOGLOU, MORAND-FEHR, 2005; PAPACHRISTOFOROU e MARKOU, 2006; BRASIL, 2006; VALERIO et al., 2009; BRASIL, 2015).

A *Corynebacterium pseudotuberculosis* é o agente patogênico responsável pela linfadenite caseosa (LC), um bacilo pleomórfico gram-positivo, patógeno intracelular facultativo de macrófagos (PASCUAL et al, 1995; VALE et al., 2003; IVANOVIĆ et al., 2009). Identificada pela primeira vez em ovinos por Preisz em 1891 e descrita como causadora da Linfadenite Caseosa, *C. pseudotuberculosis* passou a ter sua nomenclatura atual em 1948 (MOURA-COSTA, 2002; DORELLA, 2006). Este bacilo apresenta dois possíveis biovar, biovar equi, causador de linfangite ulcerativa em eqüinos e bovinos, e biovar ovis, causador de linfadenite caseosa em caprinos e ovinos (SONGER et al. 1988).

O primeiro caso diagnosticado como infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos foi registrado em 1966 na cidade do Panamá (LOPEZ et al., 1966). A infecção por *C. pseudotuberculosis* em humanos apresenta quadro clínico similar ao da *Mycobacterium tuberculosis*, doença endêmica em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, o que dificulta o diagnóstico no início da infecção (HEGGELUND et al., 2015). O diagnóstico em humanos descrito, foi realizado com cultivo bacteriano a partir de amostras de lavagem brônquica ou biópsia do paciente, com os microrganismos cultivados identificados por meio de provas bioquímicas e confirmada a identidade do patógeno por meio de PCR e Sequenciamento Genômico (HEGGELUND et al., 2015).

A citometria de fluxo fornece uma técnica de alta sensibilidade para detecção e avaliação individual de células, que não demanda tratamentos complexos da amostra ou isolamento de alvo da mesma. Esta técnica é bem estabelecida nas ciências da saúde como método de diagnóstico para diversas doenças. A partir destes modelos, diversos protocolos para avaliação de contaminação, crescimento e características bacterianas têm

sido desenvolvidos (BERGQUIST et al., 2009; GIVAN, 2010).

O presente trabalho tem a finalidade de avaliar e comparar o crescimento bacteriano e a produção de antígenos e análise da sororreatividade humana de três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

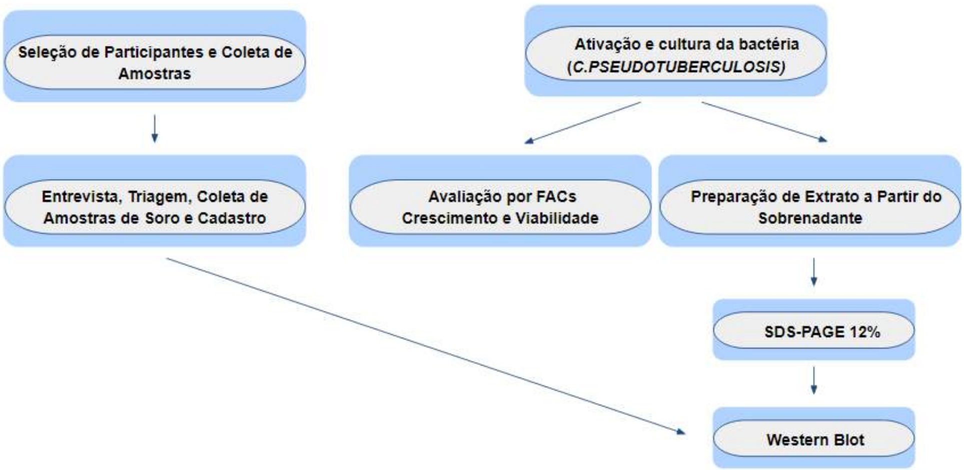


Figura 01: Fluxograma da metodologia.

2.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA), com CAAE: 57018116.9.0000.5662. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a entrevista clínico-epidemiológica.

2.2 Critério de seleção de indivíduos

Aos participantes da pesquisa foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e com o aceite os voluntários foram entrevistados, n = 12. Foram realizados testes para confirmar o não contato dos participantes com antígenos de *M. tuberculosis* (Mtb), os quais podem apresentar reatividade cruzada com os antígenos de *C. pseudotuberculosis* devido a sua proximidade filogenética. Após o teste cutâneo tuberculínico e o teste IGRA, todos os resultados foram entregues aos participantes pela pesquisadora farmacêutica bioquímica, responsável técnica e o especialista infectologista do grupo encontrava-se disponível para eventuais consultas pelos participantes, nos dias e horários para atendimento previsto no ambulatório especializado em doenças infecciosas

do Complexo Hospitalar Universitário.

O Teste Cutâneo Tuberculínico utilizado foi o Derivado Proteico Purificado de *Mtb* TCT/PPD - (Statens, Dinamarca) para investigar o possível contato com *Mycobacterium tuberculosis* conforme recomendado e autorizado pelo MS/ANVISA. Foram coletadas amostras de sangue para o teste IGRA (QTF-TBGold), para diagnóstico *in vitro* de infecção pelo *Mtb* (conforme recomendado e autorizado pelo MS/ANVISA Brasil para IGRA QTF) e para obtenção de soro. Após coleta e separação do sangue, as alíquotas de soro e plasma foram armazenadas a -20°C até o momento da análise. Assim foram selecionadas as amostras de voluntários que apresentaram resultados negativos nos testes de contato com *Mtb*.

Os participantes foram categorizados nos grupos Contactantes (trabalhadores de fazenda com pequenos ruminantes ou estudantes de laboratório de microbiologia com contado com o bacilo) e Não Contactantes (sem contato com caprinos e ovinos ou seus derivados alimentícios crus ou com o bacilo) todos com resultado TCT <5mm (negativo) e IGRA negativo. O presente trabalho fez uso de uma fração dos soros obtidos por SANTOS (2018) e previamente testados para o reconhecimento de antígenos secretados da cepa PAT10, cepa proveniente da região da Patagônia na Argentina, sendo a seleção de quatro soros do grupo Não Contactante e oito soros do grupo Contactante (quatro de fazenda e quatro de laboratório), realizada de forma aleatória com auxílio de aplicativo de sorteio. A metodologia seguiu como ilustrado no fluxograma da Figura 1.

2.3 Seleção e preparação das bactérias

As cepas VD57, CAP21 (não formadora de biofilme) e CAP76 (formadora de biofilme) de *C. pseudotuberculosis* identificadas como de interesse entre as disponíveis na coleção da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada a Biotecnologia e Imunologia (LAMABI) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) – Universidade Federal da Bahia (UFBA), foram ativadas para uso nas análises de crescimento e produção de antígenos. As cepas foram previamente avaliadas com testes de identificação e caracterização bioquímica e coloração de Gram, após ativação do banco de amostras preservadas a -20 ºC. As três cepas são caracterizadas por kit API-Coryne (BioMèrieux) e sequenciadas, VD57 GenBank com o número de acesso CP009927, CAP76 GenBank com o número de acesso CP026499 e CAP21 GenBank com o número de acesso CP026500 (ALMEIDA et al., 2016; SÁ, 2018).

2.4 Análise da concentração bacteriana por Citometria de Fluxo - FACS

Cada cepa foi separadamente reativada em placas contendo BHI-Agar a 37 ºC por 48 horas. De cada placa, com auxílio de uma alça calibrada descartável (10 μL), uma colônia pura foi isolada e inoculada em 5 mL de BHI-Caldo a 37 ºC por 48 horas. Esses pré-inóculos foram homogeneizados e 500 μL foram transferidos para expansão em balões contendo 500 mL de BHI-caldo com 0,5% de TWEEN-80, a 37ºC com agitação de 120

rpm, por 72 horas para VD57 (cepa definida como padrão para avaliação) e 48 horas para CAP21 e CAP76 (EMBRAPA 2007; SAMPAIO 2012). Das três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, nos tempos 24, 48 e 72 horas de cultura, amostras de 100 μL foram retirados e diluídos em 900 μL de PBS-TWEEN-80 0,5%, e homogeneizadas. Desse volume, 50 μL foram transferidos para tubos BD TruCount™ contendo 450 μL de PBS-T 0,5%. A esses tubos foram então adicionados 5 μL (diluído em água a concentração final de 1:2) do corante Diamond™ Nucleic Acid Dye (10.000x, PROMEGA), após homogeneizado e incubado por 20 minutos sob proteção da luz e à temperatura ambiente, foram adicionados 5 μL de Iodeto de propídio (solução 0,25 mg/mL). Finalmente homogeneizada a suspensão, foi procedida a aquisição pelo citômetro de fluxo para mensuração, com algumas modificações a partir de Sampaio (2012). As aquisições nos tempos previstos foram realizadas em quadruplicata para VD57 e em duplicata para as cepas CAP21 e CAP76. Foi determinada aquisição de 400.000 eventos por tubo, com velocidade de aquisição entre 2.000 e 3.000 eventos por segundo. A aquisição foi realizada com o programa BD CellQuest™ Pro e os valores obtidos foram analisados em Microsoft Office Excel. A fórmula para cálculo do número de células por microlitro foi, N^0 de eventos bactérias x Nº de beads adquiridas / N^0 de beads do tubo x Volume do teste em μL, seguindo protocolo do kit BD TruCount™.

2.5 Cultivo bacteriano e preparação de antígeno secretado semi-purificado

Cada cepa foi separadamente reativada em placas contendo BHI-Agar a 37 ºC por 48 horas. De cada placa, com auxílio de uma alça calibrada, uma colônia pura foi isolada e inoculada em 5 mL de BHI-Caldo a 37 ºC por 48 horas. Esses pré-inóculos foram homogeneizados e 500 μL foram transferidos para expansão em balões contendo 500 mL de BHI-caldo a 37ºC por 48 horas (EMBRAPA 2007; SÁ 2018; SANTOS 2018). Para a cepa CAP76, foi realizada uma segunda expansão com as mesmas condições exceto pela adição de 0,5% de TWEEN-80 ao meio e crescimento em agitação de 120 rpm (SAMPAIO, 2012).

Para separação da massa úmida bacteriana e do meio de cultura contendo antígenos secretados foi realizada centrifugação em tubo Falcon de 50 mL a 6.000 xG, por 20 minutos a 4 ºC. O sobrenadante foi utilizado para semi-purificação de proteínas secretadas utilizando o método de partição em três fases (Three Phase Partitioning - TPP), o qual foi filtrado a vácuo com um filtro bacteriológico de Nitrocelulose 0,22 μm (BioRad). Foram adicionados 176 g/L de Sulfato de Amônio ($(NH_4)_2SO_4$) ao sobrenadante obtido e ajustado para pH 4.0 com HCl. Em uma garrafa de 1 L foi adicionado 250 mL do sobrenadante contendo Sulfato de Amônio e 250 mL de N-butanol ($C_4H_{10}O$), homogeneizado com vigorosa agitação manual por 10 minutos. Após repouso de 1h, a interface contendo as moléculas de interesse foi cuidadosamente coletada com uma pipeta graduada e transferida para um tubo Falcon de 50 mL, após retirar o excesso de Butanol e BHI do tubo, foi adicionado Tampão Fosfato de Sódio (TFS) 0,01M pH 7.3 até atingir o volume final de 5 mL. Por fim, esse extrato semi-

purificado obtido de cada cepa foi dialisado (membrana cut-off 10 KDa - SIGMA) com 4 trocas de TFS (PAULE et al., 2004).

A concentração de proteínas do extrato de cada cepa foi dosada pelo método de Lowry (BioRad), obtendo 1,46 mg/mL (VD57), 0,914 mg/mL (CAP21), 2,67 mg/mL (CAP76 c/T) e 2,79 mg/mL (CAP76 s/T), sendo armazenados em alíquotas de 400 μL a -20 ºC.

2.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE dos antígenos das três cepas foi realizado segundo metodologia padronizada previamente por Paule e colaboradores (2003), com modificações. Utilizando gel de migração com 12% de acrilamida-bisacrilamida (29,2%-0,8%), 10% SDS, 0,75% de persulfato de amônia, 0,05% de TEMED (tetrametiletilenodiamina) em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8; e gel de empilhamento com 4% de acrilamida-bisacrilamida (29,2%-0,8%), 10% de SDS, 0,4% de persulfato de amônia, 0,05% de TEMED e tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.

As aplicações nos géis foram realizadas com ajuste para 12 μg de extrato protéico por poço do gel considerando a concentração de cada extrato obtido. Em um poço foi aplicado 1,5 μL do padrão de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 KDa (Thermo Scientific™). A migração ocorreu sob corrente elétrica de 30 mA e voltagem livre (para dois géis).

Para revelação das proteínas em gel foi utilizado o método de coloração por Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad). A análise do gel corado foi realizada com o programa GelAnalyzer2010.

3 | ANÁLISE DE REATIVIDADE ANTIGÊNICA POR WESTERN BLOTTING

3.1 Transferência eletroforética de proteínas do gel para o papel de NC

Após a eletroforese contendo 79,2 μg de extrato protéico de cada cepa em um poço de 3,3 cm o ‘’sandwich’’ foi montado em uma bandeja contendo o tampão de transferência para manter todas as camadas umedecidas, seguindo a sequência organizacional colocando-se a esponja, papel filtro, membrana de nitrocelulose (BioRad) de 0,22 μm de porosidade, gel contendo as proteínas, papel filtro e esponja, as bolhas entre as camadas foram removidas, o cassete foi fechado e o procedimento repetido para o segundo gel. Cada cassete foi então colocado no Kit Mini-Protean (BioRad), imerso em tampão de transferência. A fonte (BioRad) foi ligada com voltagem fixa de 100 V. A cuba de acrílico foi mantida dentro de recipiente com gelo para evitar superaquecimento. Após uma hora o sistema foi desligado e desmontado, o papel de nitrocelulose foi então identificado para a orientação dos lados e posição da corrida. Posteriormente o papel de nitrocelulose foi corado com Ponceau S para confirmação da transferência, descorado e cortado em fitas de 4 mm.

3.2 Imunoblotting

Cada fita contendo o extrato protéico da *Corynebacterium pseudotuberculosis* foi devidamente posicionada e colocada em tubos pré-rotulados e lavados com PBS. Após as lavagens os tubos foram imersos em solução de bloqueio contendo tampão salina 0,15M com fosfato 0,01M (pH 7,2-7,4) contendo 0,05 % de Tween-20, 5% de leite desnatado e submetidos a agitação mecânica overnight a 4°C. Após o bloqueio cada fita foi lavada com PBS-Tween 0,5% e posterior incubação com o pool de soro dos participantes sob agitação a 37°C por 1h. As fitas foram lavadas quatro vezes e incubadas com conjugado anti-IgG humana (Life technologies) sob agitação a 37°C por 1h. Após cinco lavagens com PBS-Tween-20 as fitas foram imersas em solução reveladora, 0,024g de 4-Cloro-α-Naftol (Sigma), 8 mL de metanol, 32 mL de PBS e 13,3uL e H_2O_2, sob agitação por 20 - 30 min. A revelação foi interrompida com lavagem em água destilada.

O padrão de migração eletroforética das bandas transferidas e identificadas pela reação Ag-Ac foi calculado a partir do PM relativo calculado no GelAnalyzer2010, superposto ao padrão do gel considerando as distâncias individuais de cada banda identificada. Foi analisado o padrão de bandas identificadas no gel e nas fitas após reação com soro de cada grupo estudado. Os dados encontrados foram tabulados e os resultados comparados entre os quatro extratos. Procedeu-se uma busca por similaridade entre os resultados obtidos no presente estudo e peso molecular de bandas reativas descritas em trabalhos prévios realizados com *C. pseudotuberculosis* nos preparados similares e que reagiram nos modelos de infecção humana (SANTOS, 2018) e infecção natural e experimental de ovino e caprino (MEYER, 2000; VALE et al., 2003; REBOUÇAS et al., 2013; Sá, 2018; RIBEIRO, 2019).

4 | RESULTADOS

4.1 Citometria de fluxo

Da aquisição das amostras de suspensão bacteriana, nos dados obtidos por FACs, foi estabelecida uma máscara com dois gráficos para avaliação dos eventos totais adquiridos (Figura 02). O gráfico representativo A (Figura 02-A) apresenta a distribuição dos eventos contados durante a aquisição, em uma análise de tamanho no eixo X (FSC) e complexidade interna no eixo Y (SSC), na qual foram estabelecidas duas regiões (R1; R2). Em R1 foram identificados na maior parte eventos correspondendo a células bacterianas. Em R2 encontra-se a população de beads provenientes do tubo BD-TruCount. Foi evidenciada a concentração de eventos que não correspondiam a células ou beads, sendo considerados artefatos, com maior concentração da população abaixo do ponto 10^1 do eixo Y. O gráfico representativo B (Figura 02-B) apresenta a distribuição dos eventos contados durante a aquisição, em uma análise da fluorescência identificada pelo aparelho e avaliada no gráfico do canal FL1, leitura no espectro verde no qual identifica-se o corante

Diamond™, no eixo X e do canal FL2, leitura no espectro vermelho no qual identifica-se o corante Iodeto de propídio, no eixo Y. O gráfico B é dividido em quatro quadrantes, para diferenciação entre população duplo negativa (Low/Left - LL), fluorescência no espectro verde (Low/Right - LR), fluorescência no espectro vermelho (Up/Right - UL) e fluorescência em ambos espectros (Up/Right - UR). Sendo assim, LL representa ausência de corantes e foi considerado como artefatos da leitura, LR representa presença apenas do corante Diamond™ e foi considerado como células bacterianas viáveis íntegras, UL representa presença apenas do corante Iodeto de propídio e foi considerada como células bacterianas mortas, e UR representa a presença de ambos os corantes e foi considerado como células bacterianas danificadas (com perda da integridade da membrana plasmática). As beads apresentam fluorescências com comprimento de onda específico dos canais FL-1 e FL-2 e foram subtraídas para o cálculo do número de células danificadas.

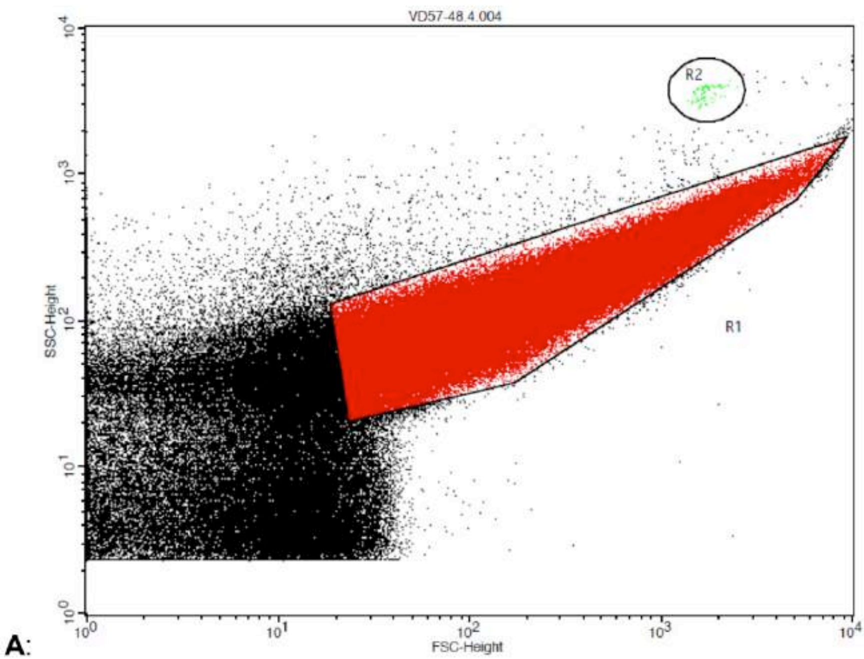
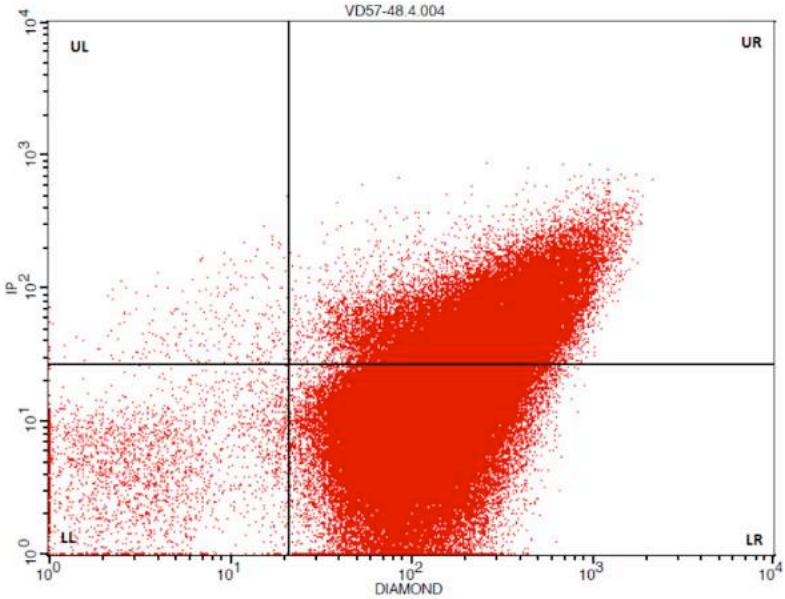


Figura 02: Parâmetros estabelecidos na Contagem bacteriana por FACs.



B:

Figura 2: **A –** Gráfico representativo, Dot Plot de aquisição da cultura de VD57 após 48 horas, em tubo BD-TruCount, em gráfico de Tamanho x Complexidade interna (FSC x SSC), com delimitação de Gates R1 (população bacteriana) e R2 (população de beads). **B –** Gráfico representativo, Dot Plot de aquisição da cultura de VD57 após 48 horas, em tubo BD-TruCount™, em gráfico de intensidade de fluorescência Diamond™ x Iodeto de propídio (DIAMOND x IP), com divisão por quadrantes LL (duplo negativo), LR (Diamond™ positivo), UL (IP positivo) e UR (duplo positivo).

4.2 Comparação dos métodos de crescimento bacteriano e análise quantitativa de *C. pseudotuberculosis*

No Quadro 01 (cepa VD57), pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e bactérias mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 ºC no período de 24, 48 e 72hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de $1x10^6$ bac/μL em 24hs, $2x10^7$ bac/μL em 48 horas e $4x10^5$ bac/μL em 72hs. Entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 31% em 24hs, 72% em 48hs e 35% em 72hs. A taxa de células com dano foi cerca de 57% no início e no final da incubação da curva de crescimento com cerca de 27% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos, cerca de 11% com 24hs e que diminui no decorrer das 48 e 72 horas para 0,7% e 2%, respectivamente.

A cepa CAP21, descrita como não formadora de biofilme (SÁ, 2017) pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado “artefato” e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/

agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 ºC no período de 24, 48 e 72hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de $7,9x10^6$ bac/μL em 24hs, $1,4x10^6$ bac/μL em 48 horas. Considerando as culturas em duplicata, entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 58% em 24hs, 68% em 48hs. A taxa de células com dano foi cerca de 40% em 24hs e cerca de 30% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos cerca de 1,6% nas 24hs e que diminui no decorrer das 48 horas para 0,7% (Quadro 01).

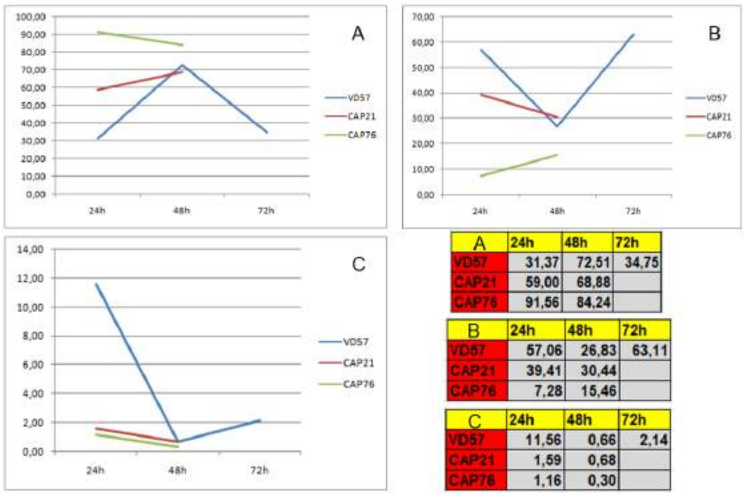
A cepa CAP76, descrita como formadora de biofilme (SÁ, 2017), pôde-se avaliar a variação na aquisição do considerado "artefato" e das bactérias viáveis íntegras, danificadas e mortas, coradas com os fluorocromos (Dymond e Iodeto de propídio) após os períodos de incubação/crescimento em meio BHI contendo 0,5% de Tween-80 em shaker/ agitador a 120 rpm sob aquecimento a 37 ºC no período de 24 e 48hs. Nas réplicas das contagens observou-se variação na taxa de replicação/crescimento de cerca de $5x10^5$ bac/ μL em 24hs e $7x10^5$ bac/μL em 48 horas. Considerando as culturas em duplicata, entre vivas íntegras, danificadas e mortas, observou-se variação do percentual de viabilidade e integridade bacteriana de cerca de 91% em 24hs e 83% em 48hs. A taxa de células com dano foi cerca de 7% em 24hs e cerca de 15% nas 48hs. Observou-se baixo percentual de bactérias mortas adquiridas nos mesmos períodos cerca de 1% nas 24hs e que diminui no decorrer das 48 horas para 0,3% (Quadro 01).

No Gráfico 01 (A), células vivas íntegras, é possível observar o crescimento da cepa VD57 com ápice no tempo de 48 horas. A variação da porcentagem de células vivas íntegras para CAP21 e CAP76 foi menor que 10%, sendo evidenciado queda na viabilidade com 48h em CAP76. Em (B), células danificadas, é possível identificar relação inversamente proporcional ao apresentado em (A). O Gráfico 01 (C), células mortas, demonstra resultados baixos de porcentagem de células mortas para todas as cepas, apresentando apenas em 24 horas para VD57 valor superior a 5% de células mortas.

Amostra	Celulas vivas totais / µL	Celulas danificadas totais / µL	Celulas mortas totais / µL	Amostra	% de celulas vivas contadas	% de celulas danificadas contadas	% de celulas mortas contadas
VD57 24h	11950,25	21943,24	4405,40	VD57 24h	31,37	57,06	11,56
VD57 48h	181147,02	67924,21	1626,35	VD57 48h	72,51	26,83	0,66
VD57 72h	25588,11	51153,88	1725,52	VD57 72h	34,75	63,11	2,14
CAP21 24h	79886,16	54823,54	2167,37	CAP21 24h	59,00	39,41	1,59
CAP21 48h	14055,34	6214,95	134,86	CAP21 48h	68,88	30,44	0,68
CAP76 24h	5507,00	437,25	69,26	CAP76 24h	91,56	7,28	1,16
CAP76 48h	7054,57	1286,67	25,06	CAP76 48h	84,24	15,46	0,30

Quadro 01: Análise da contagem e viabilidade celular.

Quadro 01: **(A)** Médias do número de células vivas integras, danificadas e mortas totais por microlitro de cultura. Cálculo a partir da aquisição em citometro de fluxo. **(B)** Média da porcentagem de células vivas integras, danificadas e mortas da cultura. Cálculo a partir da aquisição em citometro de fluxo.



A	24h	48h	72h
VD57	31,37	72,51	34,75
CAP21	59,00	68,88	
CAP76	91,56	84,24	

B	24h	48h	72h
VD57	57,06	26,83	63,11
CAP21	39,41	30,44	
CAP76	7,28	15,46	

C	24h	48h	72h
VD57	11,56	0,66	2,14
CAP21	1,59	0,68	
CAP76	1,16	0,30	

Gráfico 01: Variação da viabilidade celular de cepas de *C. pseudotuberculosis.*

Gráfico 01: **(A)** Gráfico da média da variação de células viáveis integras em porcentagem x tempo. **(B)** Gráfico da média da variação de células danificadas em porcentagem x tempo. **(C)** Gráfico da média da variação de células mortas em porcentagem x tempo.

5 I ELETROFORESE

5.1 O perfil eletroforético em SDS-PAGE do extrato de proteínas secretadas de três cepas de *C. pseudotuberculosis*.

Com a análise da eletroforese do extrato protéico das três cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* (VD57, CAP21 e CAP76 com e sem Tween-80) em SDS-PAGE 12% corado pelo método de Coomassie blue, utilizando o programa GelAnalyzer2010, foi possível observar a presença de bandas com pesos moleculares que variam de 16 KDa a 213 KDa (Figura 3 a e b).

O extrato protéico da cepa VD57 possui 17 bandas entre 16 KDa e 167 KDa, CAP21 possui 19 bandas entre 16 e 168 KDa, CAP76 cultivada com Tween-80 possui 27 bandas entre 16 e 213 KDa e, CAP76 cultivada sem Tween-80 possui 15 bandas entre 16 e 170 KDa (Figura 4c-1h).

Os pesos moleculares das bandas reveladas em cada cepa estão descritas na figura 03 e, f, g e h. Destacam-se pela presença nas três cepas estudadas sem Tween-80 as bandas de ~16, ~17, ~20, ~22, ~24, ~27, ~31, ~33, ~38, ~42, ~46, ~52, ~54, ~58, ~60, ~63, ~70, ~75, ~81, ~89, ~96, ~102, ~115, ~121, ~131, ~146, ~151, ~158, ~161, ~169,

~185 e ~213 KDa (a variação de um ponto acima ou abaixo está representando aqui com o símbolo ~).

Das bandas identificadas no gel SDS-PAGE 12% foram comuns nas três cepas, as de 169, 102, 75, 70, 31, 24, 16 KDa e entre as preparações semi-purificadas de CAP76 com e sem Tween-80 observadas encontravam-se as de 169, 161, 131, 102, 75, 70, 38, 31, 27, 24, 16 KDa.

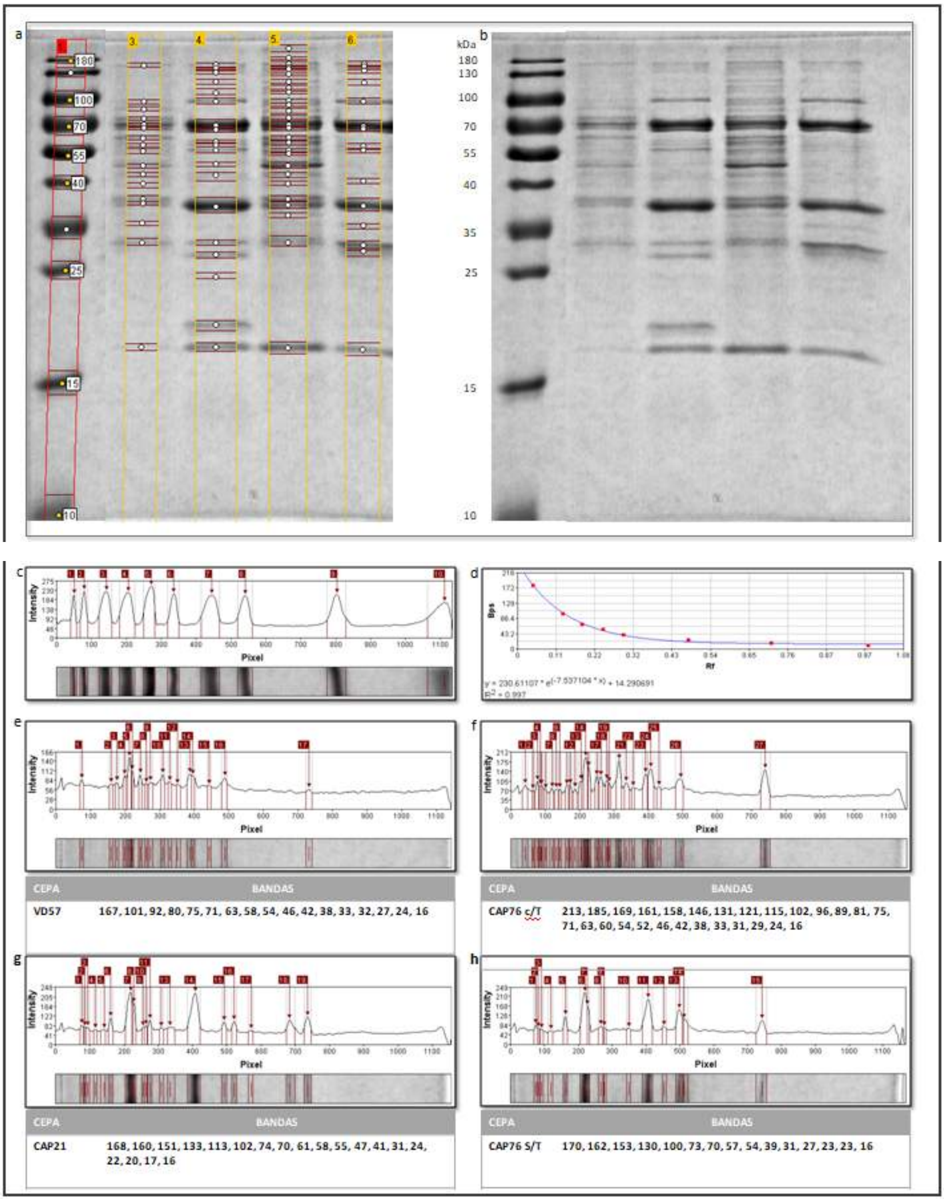


Figura 03: Perfil eletroforético dos extratos semi-purificadas de cepas cultivadas de *C.*

pseudotuberculosis.

Figura 03: Análise de eletroforese de extratos semipurificados de *C. pseudotuberculosis* crescida em caldo BHI por 48h em gel SDS-PAGE de 12% corado com Coomassie Blue em GelAnalyzer2010. (a) Perfil de bandas reveladas no Gel – **coluna 1**: PM 10-180 KDa -Thermo Scientific™, **coluna 3**: extrato VD57, **coluna 4**: CAP21, **coluna 5**: CAP76 c/Tween-80, **coluna 6**: CAP76 s/Tween-80 ; (b) Identificação as banda do PM e dos extratos no GelAnalyzer ; (c) Análise do perfil eletroforético do padrão de peso molecular PM (10 a 180 KDa – Thermo Scientific™); (d) Curva de calibração para o cálculo do peso molecular; (e- h) Determinação do PM das bandas identificadas nos quatro extratos, na ordem descrita nos respectivos quadros identificados.

Extrato proteico	213	185	169	161	158	151	146	131	121	115	102	96	89	81	75	70	63	60	58	54	52	46	42	38	33	31	27	24	22	20	17	16
VD57			X								X		X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X				X
CAP21			X	X		X		X		X	X				X	X		X	X	X		X	X			X		X	X	X	X	X
CAP 76 c/T	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X				X
CAP 76 s/T			X	X		X		X			X				X	X			X					X		X	X	X	X			X

Quadro 02: Relação de bandas protéicas presentes de PM coincidentes no gel de eletroforese SDS-PAGE 12%.

6 | IMUNOBLOTTING

6.1 Imunorreatividade de indivíduos contactantes e não contactantes com a *C. pseudotuberculosis* à antígenos semi-purificados das cepas VD57, CAP21 e CAP76 com e sem Tween-80.

Na figura 04 e quadro 03 observa-se reconhecimento pela reatividade IgG com as bandas identificadas nas amostras séricas de pool de indivíduos dos grupos contactante com a *C. pseudotuberculosis* em laboratório, fazenda e também no grupo de indivíduos que relataram não contato com a bactéria ou lida com pequenos ruminantes (não contactante).

No extrato VD57 foi reconhecida a banda de aproximadamente 151 KDa, e no CAP21 a banda de aproximadamente 135 KDa, ambas exclusivas para as respectivas cepas (Quadro 03).

Os diferentes extratos apresentaram reatividade da banda de 89 KDa no grupo não contactante, e apenas na VD57 ela aparece nos três grupos.

A banda de 68 KDa foi reconhecida em todos os extratos no grupo de contato laboratório. Em VD57, CAP21 e CAP76 S/Tween-80 apresentaram a referida banda para o grupo contactante em fazenda, apenas nos extratos CAP21 e CAP76 S/Tween-80 no grupo não contactante (Quadro 03).

Todos os extratos apresentaram a banda de 64 KDa, exceto no grupo contactante em fazenda na cepa CAP76 S/Tween-80.

Em todos os extratos a banda de aproximadamente 42 KDa apresentou reatividade, com exceção do grupo contactante em fazenda na cepa CAP76 sem Tween-80.

Os extratos CAP21 e CAP76 cultivados com Tween-80 apresentaram a banda de aproximadamente 38 e 36 KDa em todos os grupos. O extrato CAP76 sem Tween-80 apresentou apenas a banda de 38 KDa nos grupos contactante em laboratório e não

contactante. Não foram detectadas as referidas bandas no VD57.

Apenas o extrato CAP21 apresentou a banda de aproximadamente 25 KDa, contudo é possível observar uma possível banda desta altura no CAP76 sem Tween-80 no grupo contactante em laboratório. Apenas no de CAP76 cultivada com Tween-80 apresentou uma banda na altura de 18 KDa, no grupo contactante em laboratório.

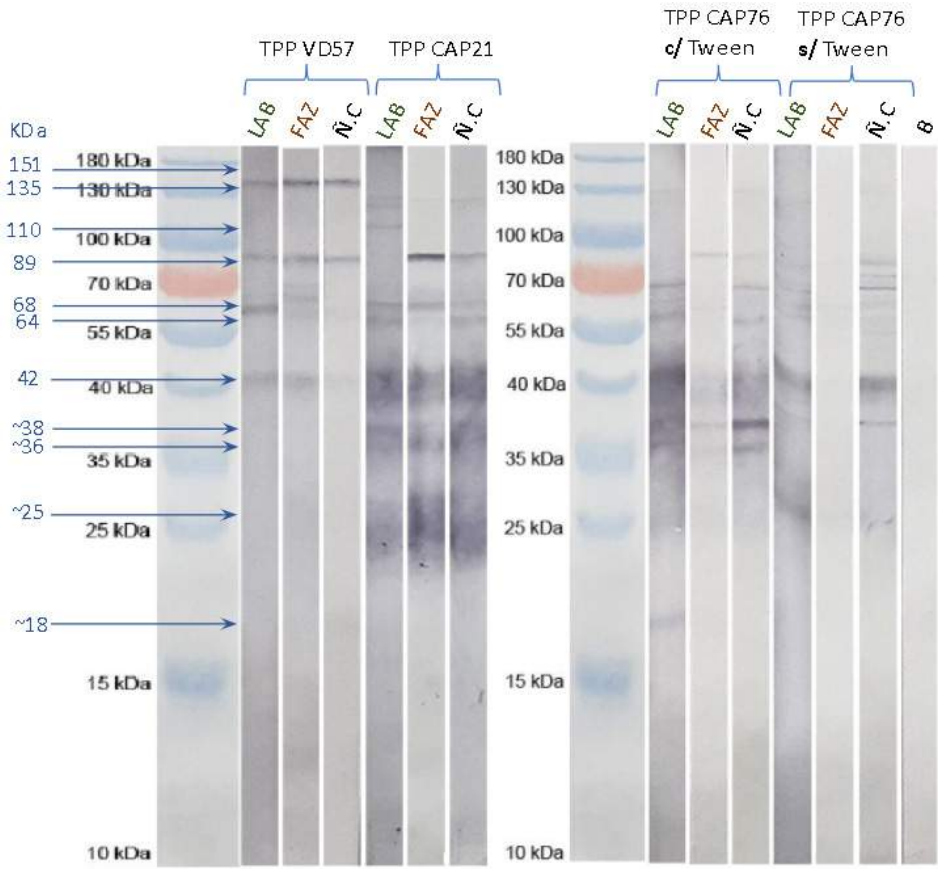


Figura 04: Western blot dos antígenos de *C. pseudotuberculosis* com soro humano.

Figura 04: Western blotting em membrana de NC (0.2 micra – Bio-Rad), a partir da eletroforese em SDS-PAGE 12%. Revelação com anti-IgG humana (Life technologies) após reatividade de pool de soros de indivíduos contactantes e não contactantes com *C. pesudotuberculosis.* Extrato semipurificado por partição em três fases (*Three Phase Partitioning* – TPP, de cepas VD57, CAP21, CAP76 com e sem Tween-80 cultivada em BHI caldo. Pesos moleculares analizados utilizando o programa GelAnalyzer2010. As setas indicam peso molecular aproximado. LAB - indivíduos com contato em laboratório; FAZ - indivíduos com contato em fazenda; Ñ.C - indivíduos sem contato; B - branco.

Extrato proetico	Bandas reconhecidas no pool de Contactantes e Não Contactantes	Bandas reconhecidas apenas no pool de Contactante
CapVD57	151; 89; 68; 64;42	68; 64
CAP21	135; 110; 89; 68; 64; 42; 38; 36; 25	110
CAP 76 c/T	89; 68; 64; 42; 38; 36; 25; 18	X
CAP 76 s/T	89; 68; 64; 42; 38; 25	X

Quadro 03: Relação de PM de bandas reconhecidas nos diferentes extratos com reconhecimento pelos grupos contactantes e não contactantes.

7 I DISCUSSÃO

7.1 Análise comparativa da contagem e rendimento de crescimento bacteriano em diferentes tempos

Métodos como avaliação da concentração por D.O., escala de Mc Farland e cultura para contagem de unidade formadora de colônia (UFC), são comumente aplicados na avaliação do crescimento de uma cultura microbiana. Apesar do baixo custo e fácil aplicação, esses métodos apresentam baixa precisão para contagem bacteriana, além de serem incapazes de avaliar a viabilidade das cepas do microrganismo em análise, visto que *C. pseudotuberculosis* cresce em paliça (NEBE-VON-CARON et al., 2000; SAMPAIO, 2012). Dessa maneira a aplicação da citometria de fluxo para contagem bacteriana é a opção mais adequada para realização de procedimentos que exigem velocidade e precisão nos resultados, como infecção experimental em modelo animal e controle de qualidade (GUNASEKERA, ATTFIELD, VEAL, 2000; HOEFEL et al.,2003; HAMMES et al., 2008; SÁ, 2018) .

Devido a sua aplicação em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa e colaboradores do LABIMUNO-UFBA, a cepa VD57 foi selecionada como modelo para avaliação do crescimento e viabilidade celular através de técnica de citometria de fluxo em três tempos de crescimento por 72 horas (MOURA-COSTA et al., 2008; BASTOS, 2011; RIBEIRO, 2019). As cepas CAP76 e CAP21 foram avaliadas apenas em dois tempos por 48 horas, tempo no qual esses cultivos são aplicados na obtenção de antígenos para teste em imunodiagnóstico animal e humano. Diferente de estudos prévios realizados por Sampaio (2012), em que se estabeleceu o uso da concentração final de 2x para SYBR-safe, no presente trabalho foi possível realizar a marcação de células viáveis aplicando a concentração final de 1:2 de Diamond™, reduzindo o consumo de corante por reação.

Na Figura 01, evidencia-se uma distribuição prolongada no gráfico A que se estende do ponto 10^0 ao ponto 10^4 do eixo X (bactérias), uma pequena distribuição uniforme e isolada no canto superior direito do gráfico (beads) e uma grande distribuição de eventos no canto inferior esquerdo (artefatos). Estas distribuições foram avaliadas com o uso de Gates para avaliação da fluorescência dos eventos ali presentes de forma isolada. A

distribuição prolongada das bactérias no gráfico A é resultante da estrutura em forma de bacilo da *C. pseudotuberculosis* (MOURA-COSTA et al., 2008; SAMPAIO, 2012). O gráfico B apresenta a fluorescência de todos os eventos adquiridos, presentes no gráfico A. O quadrante inferior esquerdo representa dupla negatividade dos marcadores IP e Diamond™ (artefatos), que foram definidos após avaliação da autofluorescência de amostras do mesmo cultivo sem adição de corante. Apesar da elevada concentração de artefatos identificados, estes permaneciam em concentrações similares em diferentes testes da metodologia realizados, não apresentados neste trabalho. Nos quadrantes UR, UL e LR, observou-se distribuição com elevada concentração de eventos em LR, indicando que dentre os eventos caracterizados com células bacterianas marcadas, cerca de 70% correspondem a células viáveis (HOEFEL et al.,2003; SAMPAIO 2012).

Foi evidenciado crescimento superior ao descrito na literatura para a cepa VD57 em 48 horas, atingindo uma concentração de $2x10^{10}$ bac/mL (Pacheco et al., 2007; Moura-Costa, 2008). As cepas CAP21 e CAP76 apresentaram crescimento compatível com o descrito por outros autores, atingindo as concentrações de $1,4x10^{9}$ e $7x10^{8}$ bac/mL (Pacheco et al., 2007; Moura-Costa, 2008). Estes resultados referem-se apenas às células viáveis íntegras. Em comparação com o crescimento celular da cepa T1 evidenciado por Sampaio (2012), apresentou declínio da viabilidade e número de células totais após 24 horas de cultivo, enquanto as cepas VD57 e CAP21 avaliadas no presente estudo, apesar de atingirem concentrações similares de células viáveis, apresentaram crescimento tardio atingindo o ápice com 48 horas de cultivo. Para CAP76 não foi evidenciada variação da concentração e viabilidade celular até 48 horas de cultivo.

7.2 Análise comparativa do perfil eletroforético dos extratos (SDS-PAGE)

Provas bioquímicas realizadas pela microbiologista do setor responsável pela coleção (dados não mostrados neste trabalho) confirmaram a ausência de contaminantes nos cultivos das cepas de *C. pseudotuberculosis*. As três cepas foram cultivadas sob as mesmas condições físicas, químicas e de tempo. Entretanto, o perfil eletroforético dos extratos secretados apresenta pequena variação na presença e no número de bandas, fenômeno já previsto para micro-organismos de mesma espécie que evoluíram em condições ambientais distintas (HOELZLE et al, 2013; SÁ, 2018).

Em comparação com perfil eletroforético de antígenos das cepas VD57, CAP21, CAP76, T1, Cp1002 e PAT10 obtidos por TPP, os resultados no presente trabalho reafirmam a diferença no perfil de proteínas secretadas entre as diferentes cepas de *C. pseudotuberculosis*, apesar de outros autores utilizarem coloração com Nitrato de Prata (MEYER, 2000; VALE, 2003; PAULE et al., 2003; BASTOS, 2011; SÁ, 2018; SANTOS, 2018).

Apesar das cepas VD57, CAP21 e CAP76 apresentarem número de bandas similar

(17, 19 e 15 respectivamente), o perfil eletroforético evidencia a diferença de expressão entre as cepas, cujas proteínas secretadas possuem diferentes pesos moleculares (HOELZLE et al, 2013; SÁ, 2018). Ao avaliar o perfil eletroforético dos dois cultivos da cepa CAP76, foram reveladas maior número de bandas quando cultivada com Tween-80, com um acréscimo de quase 100% no número de bandas visualizadas na eletroforese.

7.3 Análise comparativa do perfil de reconhecimento dos antígenos presentes nos extratos por soro humano (Western Blot)

As bandas reveladas no Immunoblotting condizem com o visualizado no gel corado com Comassie Blue, apesar da menor sensibilidade deste corante em comparação ao Nitrato de Prata na detecção de proteínas (CHEVALLET, LUCHE, RABILLOUD, 2007).

Dentre as diversas bandas visualizadas por coloração com Comassie Blue na eletroforese dos quatro extratos, de 16 a 213 KDa, onze bandas foram reveladas no immunoblotting (150, 135, 110, 89, 68, 64, 42, 38, 36, 25 e 18 KDa), sendo apenas quatro destas presentes em todos os extratos (89, 68, 64 e 42 KDa).

A sororreatividade humana avaliada em Western Blot reconheceu bandas já descritas por outros autores com as mesmas cepas ou cepas diferentes em ovinos e caprinos experimentalmente infectados (PAULE et al., 2003; HOELZLE et al., 2013; SÁ, 2018; RIBEIRO, 2019). Em comparação com o descrito por Santos (2018), dentre as principais bandas descritas pelo autor no extrato de antígeno secretado da cepa PAT10, nenhuma destas bandas foi evidenciada em Western blot com os extratos do presente trabalho.

O extrato antigênico da cepa PAT10 produzido e avaliado por Santos (2018), permitiu a discriminação entre indivíduos contactantes e não-contactantes, por revelação das bandas de 31, 71, 164 e 275 KDa, enquanto que no presente estudo as bandas de 64 e 68 KDa em VD57 são reconhecidas apenas pelos grupos Contactantes e não foi possível identificar bandas cuja reatividade permita evidenciar diferença entre Contactantes e Não Contactantes em CAP21 e CAP76. A phospholipase D (PLD) com peso molecular de 31 KDa, é um fator de virulência da *C. pseudotuberculosis* comumente descrito em experimentos de imunodiagnóstico com extratos de antígenos somáticos ou secretados de diferentes cepas, com soro humano, caprino ou ovino (PAULE et al., 2003; MOURA-COSTA et al., 2008; HOELZLE et al., 2013; SÁ, 2018; SANTOS, 2018).

A sororreatividade de antígenos de *C. pseudotuberculosis* é bem estudada para fins de diagnóstico de infecção ou vacinas para animais (REBOUÇAS et al, 2013), e mais recentemente para humanos (SANTOS, 2018). No presente trabalho com as cepas VD57, CAP21 e CAP76 provenientes da mesma região geográfica, submédio São Francisco - Juazeiro, Bahia, Brasil (MOURA-COSTA et al, 2008; SÁ et al, 2013 e 2018), utilizando a técnica de Western blot, foi possível evidenciar diferença do grupo Contactante para grupo Não Contactante com *C. pseudotuberculosis* apenas no extrato da cepa VD57.

CONCLUSÕES

- A cepa VD57 apresenta crescimento tardio.

- A VD57 apresenta crescimento superior e viabilidade inferior em comparação às cepas CAP21 e CAP76 nos tempos estudados de 24 e 48 horas.

- Observa-se baixa mortalidade das três cepas em meio BHI nos tempos estudados.

- O perfil eletroforético dos extratos das cepas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* cultivadas sob mesmas condições, apresentam similaridade no número de bandas e grande diferença no perfil eletroforético.

- A utilização de Tween-80 no meio de cultivo de CAP76 induziu um grande aumento no número de bandas.

- Os extratos apresentam antigenicidade em soro humano. Há diferença no perfil de reconhecimento de Contactantes e Não Contactantes nos extratos de VD57 e CAP21.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Anticorpos e Antígenos. In: Imunologia Celular e Molecular. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 89-107, 2011.

ALMEIDA, S., TIWARI, S., MARIANO, D., SOUZA, F., JARNAL, S. B., COIMBRA, N., RAITTZ, R. T., DORELLA, F. A., CARVALHO, A. F., PEREIRA, F. L., SOARES, S. C., LEAL, CARLOS, A. G., BARH, D., GHOSH, P., FIGUEIREDO, H., MOURACOSTA, L. F., PORTELA, R. W., MEYER, R., SILVA, A., AZEVEDO, A. The genome anatomy of *Corynebacterium pseudotuberculosis* VD57 a highly virulent strain causing Caseous lymphadenitis. Standards in Genomic Sciences, v. 11, n. 1, p. 29, 2016.

BASTOS, B. L. Resposta imune de ovinos a antígenos secretados de *Corynebacterium pseudotubeculosis* associados a saponinas de Quillaja saponaria como adjuvantes e prospecção de antígenos somáticos com potencial aplicabilidade em sistemas de imunodiagnóstico. Tese (Doutorado em imunologia), UFBA – Salvador, p. 92, 2011.

BENHAM, C. L.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in diseases of animals. Commonwealth Bureau of Animal Health, n. 32, p. 645-657, 1962.

BERGQUIST, P. L.; HARDIMAN, E. M.; FERRARI, B. C.; WINSLEY, T.. Applications of flow cytometry in environmental microbiology and biotechnology. Extremophiles, v. 13, n. 3, p. 389-401, 2009.

BOYAZOGLU, J.; HATZIMINAOGLOU, I.; MORAND-FEHR, P. The role of the goat in society: Past, present and perspectives for the future. Small Ruminant Research, v. 60, p. 13-23, Jul. 2005.

BRASIL. Censo Agropecuário 2006. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Agropecuária, Recursos Naturais e Geografia. Divulgação digital. 2006. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/51/agro_2006.pdf> Acesso em: 26 de Jan. de 2017.

BRASIL. Produção da Pecuária Municipal. Ministério da Agricultura; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Agropecuária, Recursos Naturais e Geografia. Divulgação digital. v.43, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf> Acesso em: 26 de Jan. de 2017.

BRASIL b. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasil livre da tuberculose. Plano nacional pelo fim da tuberculose como problema de saúde pública [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 52 p. Disponível em: https://drive.google.com/file/d/0B0CE2wqdEaReVc5V3cyMVFPcTA/view. Acesso em: 18 de Jun. de 2019.

BUZATU D. A.; MOSKAL, T. J.; WILLIAMS, A. J.; COOPER, W. M.; MATTES, W. B.; WILKES, J. G. An Integrated Flow Cytometry-Based System for Real- Time, High Sensitivity Bacterial Detection and Identification. PLoS One, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014.

CARMINATI, R.; BAHIA, R.; FERREIRA DE MOURA COSTA, L.; JEAN, B.; PAULE, A.; LÚCIA VALE, V.; REGIS, L.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; MEYER, R. Determinação da sensibilidade e da especificidade de um teste de ELISA indireto para o diagnóstico de linfadenite caseosa em caprinos. Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 2, n. 1, p. 88–93, 2003.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Author manuscript, v. 1, n. 4, p. 1852-1858, 2006.

DERCKSEN, D. P.; BRINKHOF, J. M. A.; DEKKER-NOOREN, T.; MAANEN, K. Van; BODE, C. F.; BAIRD, G.; KAMP, E. M. A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. Veterinary Microbiology, v. 75, p. 167-175, Abr. 2000.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L. G. C.; OLIVEIRA, S. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Veterinary Research, v. 37, n. 2, p. 201–218, 2006.

ELLIS, T. M.; SUTHERLAND, S. S.; WILKINSON, F. C.; MERCY, A. R.; PATON, M. W. The role of *Corynebacterium pseudotuberculosis* lung lesions in the transmission of this bacterium to other sheep. Australian Veterinary Journal, v. 64, n. 9, p. 261–263, Set. 1987.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity of antibody responses to *Corynebacterium pseudotuberculosis* in naturally infected sheep with caseous lymphadenitis. Vet. Immunol. Immunopathol., n. 28, p. 289-301, 1991a.

ELLIS, J. A.; HAWK, D. A.; MILLS, K. W.; PRATT, D. L. Antigen specificity and activity of ovine antibodies induced by immunization with *Corynebacterium pseudotuberculosis* culture filtrate. Vet. Immunol. Immunopathol., n. 28, p. 303-316, 1991b.

EMBRAPA. Linfadenite Caseosa: o Estado da Arte. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos. Divulgação digital. v.1, 2007. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/526524/linfadenite-caseosa-o-estado-da-arte> Acesso em: 26 Jan. 2017.

Estevao-Belchior, S.; Gallardo, A.; Abalos, A.; Jodor, N.; Jensen, D. Actualización sobre linfoadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad. Ve. Argentina, 23, p. 258–278, 2006.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. Small Ruminant Research. v. 76, p. 42 – 48, 2008.

GIVAN, A. L. Flow Cytometry: An Introduction. In: Hawley T., Hawley R. (eds) Flow Cytometry Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), ed. 3, v. 699, p. 1-29, Humana Press, 2011.

GUNASEKERA, T. S.; ATTFIELD, P. V.; VEAL D. A. A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. Applied And Environmental Microbiology, v. 66, n. 3, p. 1228-1232, 2000.

HAMMES, F.; BERNEY, M.; WANG, Y.; VITAL, M.; KÖSTER, O.; EGLI, T. Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. Water Research, v. 42, p. 269-277, 2008.

HEGGELUND, L.; GAUSTAD, P.; HÅVELSRUD, O. E.; BLOM, J.; BORGEN, L.; SUNDSET, L.; SØRUM, H.; FRØLAND, S. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* pneumonia in a veterinary student infected during laboratory work. In: Open forum infectious diseases. Oxford University Press, 2015.

HOEFEL, D.; GROOBY, W. L.; MONIS, P. T.; ANDREWS, S.; SAINT, C. P. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. Journal of Microbiological Methods, n. 55, p. 585 – 597, 2003.

HOELZLE, L. E.; SCHERRER, T.; MUNTWYLER, J.; WITTENBRINK, M. M.; PHILIPP, W.; HOELZLE, K. Differences in the antigen structures of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and the induced humoral immune response in sheep and goats. Veterinary microbiology, v. 164, n. 3-4, p. 359-365, 2013.

IVANOVIĆ, S.; ŽUTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, I.; ŽUJOVIĆ, M. Caseous lymphadenitis in goats. Biotechnology in Animal Husbandry, v. 25, n. 5-6-2, p. 999-1007, 2009.

JOIN-LAMBERT, O. F.; OUACHE, M.; CANIONI, D.; BERETTI, J. L.; BLANCHE, S.; BERCHE, P.; KAYAL, S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* necrotizing lymphadenitis in a twelve-year-old patient. The Pediatric infectious disease journal, v. 25, n. 9, p. 848-851, 2006.

KESLIN, M. H.; McCOY, E. L.; McCUSKER, J. J.; LUTCH, J. S. *Corynebacterium pseudotuberculosis*: A New Cause of Infectious and Eosinophilic Pneumonia. The American Journal of Medicine, v. 67, n. 2, p. 228-231, 1979.

KUMAR, J. S.; PARIDA, M. M.; LAKSHMANA RAO, P. V. Development & evaluation of biotinylated DNA probe for clinical diagnosis of chikungunya infection in patients' acute phase serum & CSF samples. Indian Journal of Medical Research, v. 138, p. 117-124, Jul. 2013.

KURIA, J. K. N.; MBUTHIA, P. G.; KANG'ETHE, E. K.; WAHOME, R. G.; Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection. Veterinary Research Communications, v. 25, p. 89–97, 2001.

LIN, P. L.; FLYNN, J. L. Understanding latent tuberculosis: a moving target. The Journal of Immunology, v. 185, n. 1, p. 15-22, 2010.

LOPEZ, J. F.; WONG, F. M.; QUESADA, J. *Corynebacterium pseudotuberculosis* first case of human infection. American Journal of Clinical Pathology, v. 46, n. 5, p. 562-567, 1966.

MADRUGA, M. S.; BRESSAN, M. C. Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technological developments. Small Ruminant Research, n. 98, p. 39-45, 2011.

MATOS, E. D.; LEMOS, A. C. M.; BITTENCOURT, C.; MESQUITA, C. L. Anti-tuberculosis drug resistance in strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in a tertiary hospital in Bahia. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 11, n. 3, p. 331-338, 2007.

MCGUIRE, A. M.; WEINER, B.; PARK, S. T. WAPINSKI, I.; RAMAN, S.; DOLGANOV, G.; PETERSON, M.; RILEY, R.; ZUCKER, J.; ABEEL, T.; WHITE, J.; SISK, P.; STOLTE, C.; KOEHRSEN, M.; YAMAMOTO, R. T.; LACOBELLI-MARTINEZ, M.; KIDD, M. J.; MAER, A. M.; SCHOOLNIK, G. K.; REGEV, A.; GALAGAN, J. Comparative analysis of Mycobacterium and related Actinomycetes yields insight into the evolution of Mycobacterium tuberculosis pathogenesis. BMC genomics, v. 13, n. 1, p. 120, 2012.

MOURA-COSTA L. F. *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos. Revista de Ciências Médicas e Biológicas., v.1, n.1, p.105-115, 2002.

MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; VALE, V. L. C.; PAULE, B. J. A.; PORTELA, R. W.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; BARRETO, L. M. S.; MEYER, R. Evaluation of the humoral and cellular immune response to different antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* in Canindé goats and their potential protection against caseous lymphadenitis. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 126, n. 1-2, p. 131-141, 2008.

MEYER, R. J. N. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* e o hospedeiro caprino: aspectos da imunidade, do imunodiagnóstico e da prevalência**. 2000. Tese (Doutorado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2000.

MEYER, R.; CARMINATI, R.; CERQUEIRA, R. B.; VALE, V.; VIEGAS, S.; MARTINEZ, T.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; SILVA, J. A. H.; RIBEIRO, M.; RÉGIS, M.; PAULE, B.; FREIRE, S. M. Avaliação da resposta imune humoral em caprinos inoculados com uma vacina viva atenuada liofilizada contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v. 1, n. 1, p. 42-48, nov. 2002.

NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P. J.; HEWITT, C. J.; POWELL, J. R.; BADLEY, R. A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. Journal of Microbiological Methods, n. 42, p. 97–114, 2000.

NÓBREGA, K. F. Linfadenite caseosa: Revisão e considerações sobre a utilização de vacinas no Brasil. Monografia - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, 2010.

PACHECO, L. G. C.; PENA, R. R.; CASTRO, T. L. P.; DORELLA, F. A.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; FROTA, M. N. L.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; ALVES, F. S. F.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Multiplex PCR assay for identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* from pure cultures and for rapid detection of this pathogen in clinical samples. Journal of Medical Microbiology, n. 56, p. 480-486, 2007.

PAPACHRISTOFOROU, C.; MARKOU, M. Overview of the economic and social importance of the livestock sector in Cyprus with particular reference to sheep and goats. Small Ruminant Research, n. 62, p. 193-199, 2006.

PASCUAL, C. LAWSON, P. A.; FARROW, J. A.; GIMENEZ, M. N.; COLLINS, M. D. Phylogenetic Analysis of the Genus Corynebacterium Based on 16s rRNA Gene Sequences. International Journal Of Systematic Bacteriology, Reino Unido, v. 45, n. 4, p. 724-728, out. 1995.

PAULE, B. J. A.; MEYER, R.; MOURA-COSTA, L. F.; BAHIA, R. C.; CARMINATI, R.; REGIS, L. F.; VALE, V. L. C.; FREIRE, S. M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.; AZEVEDO, V. Three-phase partitioning as an efficient method for extraction/concentration of immunoreactive excreted–secreted proteins of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Protein Expression and Purification, v. 34, n. 2, p. 311-316, 2003.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, R. C.; VALE, V. L. C.; MOURA-COSTA, L. F.; FREIRE, S. M.;SCHAER, R.; GOES, A. M.; MEYER, R. Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon-γ production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting. Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 96, n. 3-4, p. 129-139, 2003.

PEEL, M. M.; PALMER, G. G.; STACPOOLE, A. M.; KERR, T. G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of tem cases from Australia and review. Clin. Infect. Dis., v. 24, n. 2, p. 185- 191, 1997.

PEPIN, M.; PATON, M.; HODGSON, A. L. M. Pathogenesis and epidemiology of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Current Topics in Veterinary Research, n. 1, p. 63-82, 1994.

REBOUÇAS, M. F.; LOUREIRO, D.; BASTOS, B. L.; MOURA-COSTA, L. F.; HANNA, S. A.; AZEVEDO, V.; MEYER, R.; PORTELA, R. W. Development of an indirect ELISA to detect *Corynebacterium pseudotuberculosis* specific antibodies in sheep employing T1 strain culture supernatant as antigen. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 33, n. 11, p. 1296-1302, 2013.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C.; BARBOSA, P. G.; NARDI JÚNIOR, G.; LISTONI, F. J. P. Punção Aspirativa Com Agulha Fina No Diagnóstico do *Corynebacterium Pseudotuberculosis* Na Linfadenite Caseosa Caprina. Arquivo Instituto Biologia, São Paulo, v.68, n.1, p.23-28, jan./jun. 2001.

RIBEIRO, M. B. **Aspectos da resposta imune ovina contra *Corynebacterium pseudotuberculosis* cepa cp_VD57 em infecção experimental**. 2019. 152 f. Tese (Doutorado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2019.

SÁ, M. C. A. GOUVEIA, G. V.; KREWER, C. DA C.; VESCHI, J. L.; DE MATTOS-GUARALDI, A. L.; DA COSTA, M. M. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. Genetics and Molecular Biology, Brasil, v. 36, n. 2, p. 265-268, fev. 2013a.

SÁ, M. C. A., VESCHI, J. L. A., SANTOS, G. B., AMANSO, E. S., OLIVEIRA, S. A. S., MOTA, R. A., VENERONI-GOUVEIA, G., COSTA, M. M. Activity of disinfectants and biofilm production of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 33, n. 11, p. 1319-1324, 2013.

SÁ, M. C. A. ***Corynebacterium pseudotuberculosis*: Aspectos moleculares de cepas produtoras e não produtoras de biofilme e da resposta imune por elas induzida numa infecção experimental em caprinos**. 2018. 155 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO))-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2018.

SAMPAIO, G. P. Padronização de técnicas por citometria de fluxo, para avaliar viabilidade e aspectos da interação entre *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. 42 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Bahia. 2012.

SANTIAGO, L. B. et al. Determinação da curva de crescimento da *Corynebacterium pseudotuberculosis*. In: 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 46., 2009, Paraná.

SANTOS, R. M. **Estudo da Imunorreatividade Humana *in vitro* a Antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis***. 2018. 49 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia)-Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, 2018.

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A. S.; PACHECO, L. G. C.; PORTELA, R. W.; BASTOS, B. L.; DORELLA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; GOUVEIA, A. M. G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA. Research in Veterinary Science, v. 88, p. 50-55, 2010.

SILVA, W. M.; SEYFFERT, N.; SANTOS, A. V.; CASTRO, T. L.; PACHECO, L. G.; SANTOS, A. R.; CIPRANDI, A.; DORELLA, F. A.; ANDRADE, H. M.; BARH, D.; PIMENTA, A. M.; SILVA, A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. Identification of 11 new exoproteins in *Corynebacterium pseudotuberculosis* by comparative analysis of the exoproteome. Microbial Pathogenesis, p. 37-42, 2013.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEYL, L. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Am. J. Vet. Res., v. 49, n. 2, p. 223-226, 1988.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8.ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 894p, 2005.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R.; PAULE, A.; NASCIMENTO, I.; MEYER, R. Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Revista de Ciências Médicas e Biológicas n. 2, p. 192–200, Jan/Dez. 2003.

VALERIO, D.; GARCÍA, A.; PEREA, J.; ACERO, R.; GÓMEZ, G. Caracterización social y comercial de los sistemas ovinos y caprinos de la región noroeste de república Dominicana. Interciencia, v. 34, n. 9, Set. 2009.

WILLIAMSON, L. H. Caseous Lymphadenitis en Small Ruminants. Veterynary Clinics of North America: Food Animal Pratice. n. 2,v.17, p.359-371, 2001.

ANEXO 01

Análise da concentração e viabilidade celular das três cepas de *C. pseudotuberculosis* por FACS

04.02.19	VD57 24h	6749	11855	2443	378902	51	49750	500	13167,17	23029,37	4766,25	739230,37	32,14	56,22	11,64	94,75
04.02.19	VD57 24h	7328	12634	2452	377529	57	49750	500	12791,86	21954,59	4280,25	659019,92	32,78	56,26	10,97	94,41
04.02.19	VD57 24h	4984	8850	1911	384194	61	49750	500	8129,64	14336,16	3117,12	626677,10	31,78	56,04	12,18	96,08
04.02.19	VD57 24h	6615	13774	2633	376930	48	49750	500	13712,34	28452,85	5457,99	781344,48	28,79	59,75	11,46	94,26
05.02.19	VD57 48h	196940	70414	1886	130263	497	49750	500	39427,63	13997,47	377,58	26078,81	73,28	26,02	0,70	32,65
05.02.19	VD57 48h	207154	73651	1850	117248	97	49750	500	212493,02	75449,72	1897,68	120269,86	73,31	26,03	0,65	29,33
05.02.19	VD57 48h	206546	78585	1823	112954	92	49750	500	223383,99	84891,89	1971,61	122162,21	72,00	27,36	0,64	28,25
05.02.19	VD57 48h	207945	81296	1884	108792	83	49750	500	249283,46	97357,75	2258,53	130419,33	71,45	27,90	0,65	27,21
06.02.19	VD57 72h	85746	132554	5022	173500	3178	49750	500	2684,62	4050,63	157,23	5432,11	38,95	58,77	2,28	44,08
06.02.19	VD57 72h	92770	178219	5031	122023	1957	49750	500	4716,72	8961,71	255,79	6204,03	33,85	64,31	1,84	30,81
06.02.19	VD57 72h	98424	187038	6477	106511	1550	49750	500	6318,19	11907,13	415,78	6837,32	33,89	63,88	2,23	26,84
06.02.19	VD57 72h	94423	191541	6470	107460	106	49750	500	88632,91	179696,06	6073,25	100870,47	32,30	65,49	2,21	26,88
400000 eventos adiquiridos	Amostra	celulas vivas contadas	Nº de celulas danificadas contadas	Nº de celulas mortas contadas	Nº de artefatos contados	Nº de Beads contadas	Nº de Beads do Kit	Volume do teste	Celulas vivas totais / µL	Celulas danificadas totais / µL	Celulas mortas totais / µL	Artefatos totais / µL	% de celulas vivas contadas	% de celulas danificadas contadas	celulas mortas contadas	% de artefatos contados
04.02.19	CAP21 24h	58821	36477	1569	303024	109	49750	500	53694,40	33198,31	1432,25	276613,65	60,79	37,59	1,62	75,80
04.02.19	CAP21 24h	87421	63085	2392	247020	82	49750	500	106077,92	76448,76	2902,49	299737,68	57,21	41,23	1,57	61,78
05.02.19	CAP21 48h	86676	39518	894	271648	1264	49750	500	6822,99	3011,29	70,37	21383,68	68,89	30,40	0,71	68,34
05.02.19	CAP21 48h	188487	84276	1765	124591	881	49750	500	21287,69	9418,62	199,34	14071,29	68,88	30,48	0,64	31,29
200000 eventos adiquiridos	Amostra	celulas vivas contadas	Nº de celulas danificadas contadas	Nº de celulas mortas contadas	Nº de artefatos contados	Nº de Beads contadas	Nº de Beads do Kit	Volume do teste	Celulas vivas totais / µL	Celulas danificadas totais / µL	Celulas mortas totais / µL	Artefatos totais / µL	% de celulas vivas contadas	% de celulas danificadas contadas	celulas mortas contadas	% de artefatos contados
03.01.19	CAP76 24h	95979	9119	1097	292144	1661	50600	500	5847,73	454,39	66,84	17799,50	91,82	7,13	1,05	73,65

CAPÍTULO 7

REVIEW ON MICROBIAL LEVAN: SOURCES AND POTENCIAL USES

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 26/01/2022

Beatriz Ferreira
Universidade Positivo, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Curitiba, Paraná
http://lattes.cnpq.br/3471291157442873

Camila Follador Lemos
Universidade Positivo, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Curitiba, Paraná
http://lattes.cnpq.br/5750522129586287

Fernanda Prehs Izar
Universidade Positivo, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Curitiba, Paraná
http://lattes.cnpq.br/9631694873941408

Thabata Maria Alvarez
Universidade Positivo, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia
Curitiba, Paraná
http://lattes.cnpq.br/5098256501937905

ABSTRACT: Levan is an extracellular polysaccharide that consists of fructose units bound by glyosidic β-(2,6) bonds, produced by several types of microorganisms from substrates containing sucrose. Its molecular structure presents thermal stability and low viscosity, which holds interest to applications in industrial sectors. The challenge, however, is in the large-scale production, since an economic viable method has not yet been consolidated. The purpose of this work was to explore the application of microbial levan at a large scale context.

KEYWORDS: Polysaccharide, bioprocess, renewable materials

1 I LEVAN

Levan is a non-structural polysaccharide synthetized by different types of microorganisms, which include Archeas, yeast, and a wide range of bacteria, besides also some plant species. It is constituted by fructose units linked by type β-(2,6) glyosidic bonds, building compact nanospheres, which can have many potential applications. Its characteristics result in a considerably low intrinsic viscosity (ARVIDSON; RINEHART; GADALA-MARIA, 2006) and a superior structural stability when compared to homologue linear molecules (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016; SRIKANTH, 2015).

The microbial polymer is synthetized from sucrose-based substrates, usually by bacteria, such as the ones from genera *Acetobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus e Zymomonas* or directly from the isolated enzyme levansucrase (JAKOB et al., 2013; RUNYON et al., 2014).

In high sucrose concentration media, levan can represent up to 97% of the total biofilm exopolysaccharide (EPS) produced by *Bacillus*

subtilis (DOGSA et al., 2013; ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016). The presence of levan in these biofilms, together with other EPS, confers higher stability, as it helps to bind the microbial cells (DOGSA et al., 2013). Dogsa et al. (2013) proposed that, biologically, the conversion of sucrose to levan can make the biofilm more resistant and that the mechanism happens due to the need of *B. subtilis* to store carbon in competitive environment.

Because it is an extracellular substance, it is affected by fermentation conditions like pH, oxygen concentration, bioreactor settings and composition of culture media (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016). The microbial source of the levansucrase enzyme is also an important factor that can bring different characteristics to the final product, modifying properties such as molecular weight, branching degree, diameter, intrinsic viscosity, stability and functional aspects like adhesive strength (JAKOB et al., 2013; RUNYON et al., 2014; ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016).

In general terms, levansucrase originated by gram-positive bacteria, such as the one from *B. subtilis*, produce the polymer without accumulating intermediate oligofructans, unlike gram-negative species, which generate high levels of secondary products, therefore, a lower yield of levan (HOMANN et al., 2007; ADAMBERG et al., 2015; CAPUTI et al., 2013).

Fructans derived from bacteria present a higher degree of polymerization when compared to the ones originated by plants. The bacterial levan, for example, can reach higher molecular weights, even more than 500 kDa, and with a number of fructosyl units between 10^3 and 10^4, while plants produce levan with a range of 10^1 to 10^2 fructosyl units (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016).

The degree of polymerization is due to a progressive mechanism that, after enzymatic cleavage of sucrose, a new fructose unit is added to the growing chain, which is progressively elongated and that is maintained bonded to the enzyme (OZIMEK et al., 2006). Part of the released glucose is metabolized by the microorganism and used for growth, the remaining is simply accumulated in the fermentation media (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016). When the main substrate, sucrose, is extinguished, the synthetized polymer functions as a source of fructosyl units. The levansucrase enzyme breaks the glycosidic β-(2,6) bonds along the levan chain, releasing terminal fructose in a consecutive way, until the reaction stops when it meets a branch point (MÉNDEZ-LORENZO et al., 2015), represented by glycosidic β-(2,1) bonds. The branches protect the chain from hydrolysis from levansucrase itself (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016).

2 | LEVANSUCRASE

Levansucrase is an extracellular enzyme that synthetize levan from sucrose. It remains bonded to the cell surface until its release to the external environment by an enzymatic secretion route, which varies according to the host specimen. The secretion of

levansucrase in gram-positive bacteria involves cleavage with precursors containing signal-peptide (VAN HIJUM, 2004; WALDHERR; MEISSNER; VOGEL, 2008).

Most of the species have a single gene responsible for the generation of this enzyme. In the *B. subtilis*, for example, the gene that codes for levansucrase is *sac*B (CRUTZ et al., 1990). In some bacteria, like in *Bacillus*, sucrose is indispensable to induct its transcription (CHOI et al., 2004; INTHANAVONG et al., 2013).

Bacteria can contain the gene for levansucrase as well as the gene that encodes for levanase, which is responsible for hydrolysis of levan molecules. Levanase production is induced by low concentration of fructose in the reactional media and it is inhibited by glucose, the primary product of sucrose transfructosylation (MENÉNDEZ et al., 2009; ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016). It is known that, in the presence of fructose, levansucrase from *B. subtilis* creates a covalent fructosyl-enzyme complex, responsible for transfructosylation. This reaction occurs when the fructosyl residues is transferred to sucrose elongating the growing chan. Apart from this reaction, studies show that levansucrase itself can exhibit levanase activity as one of its intrinsic properties. It acts by utilizing levan as a substrate and, by means of an enzyme-fructosyl complex, behaves like a hydrolytic or transferase enzyme releasing fructose units (MÉNDEZ-LORENZO et al., 2015).

Whenever sucrose is available, the cells possess a restrict control in order to prioritize levan synthesis, instead of its degradation (VAN HIJUM, 2004; WALDHERR; MEISSNER; VOGEL, 2008). Research involving gene expression and evolutive analysis imply that synthesis and degradation of levan are, at the same time, exclusive and complementary processes, and the behavior depends on the bacterial habitat (MÉNDEZ-LORENZO et al., 2015).

3 I LEVAN APPLICATIONS

Products containing levan in their formulation are limited in the market, mainly as a consequence of the challenges encountered for production in large scale. Despite that, intrinsic properties of levan attract relevant interest of a variety of industrial sectors to the polyssacharide. In cosmetical industries, for example, wide used international tests confirm that levan meets the safety requirements to be used in cosmetics, which demonstrate that the biopolymer does not cause irritation or allergy and that it is not toxic (MONTANA POLYSACCHARIDES, 2015).

In addition to the cosmetical industry, many other applications are being explored by other market sectors, such as food and health industries. Tables 1 and 2 point some of these applications already used or in study, based on their physical, chemical and biological properties. Table 1 summarizes reports of levan's exploration in scientific articles, while Table 2 reunites some patents conceded and some solicitated for some levan applications, found in international databases. These data confirm the relevance of the polymer to diverse

market areas.

Some present examples of levan producers are Natural Polymers Inc., from the United States, which utilizes *B. subtilis* as the producer microorganism, the Chinese company Real Biotech Co., which produces it from *Zymomonas mobilis,* and the Japanese company Advance Co., producing levan from *Streptococcus salivarius*. Only a few companies sell products in which levan is one of the main ingredients. An example of one that does it is the Swiss company Rahn with its levan-based products Proteolea® e o Slimexir® (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016). According to the online catalog of this company, Proteolea® slows down facial cellular aging and Slimexir® ensures reduction of fat accumulation in abdominal adipocytes, decreasing the volume of this body portion corporal (RAHN, 2018).

Industrial segment	Application	Description	Reference
Cosmetics	Moisturizing	The polymer is effective as a moisturizing lotion, it showed similar properties to hyaluronic acid.	Kim et al. 2005
	Hair resistance	Tests demonstrated a decline in lifting of hair cuticles in treatment containing levan.	Öner et al. 2016
Medicine	Healing agent	Showed that levan acts in an important step of healing burned or mechanical damaged tissue.	Sturzoiu et al. 2011
	Healing agent	Showed that levan acts in an important step of healing burned or mechanical damaged tissue.	Sturzoiu et al. 2011
	Bones regeneration	Levan methacrylate spheres combined with glass nanoparticles demonstrated considerable adhesive resistance when applied to bone renegeration.	Leite et al. 2014
	Anti-inflammatory	It has been concluded that levan can act directly in reducing stimulation of leucocyte adhesion to the cell of blood vessels.	Sedgwick et al. 1984
	Weight loss	A levan and ginseng-based diet tested in mice resulted in reduction of white adipose tissue weight, lower blood glucose in fasting, lower resistance to insulin and leptin in mice.	Oh et al. 2014
	Cholesterol reduction	Serum cholesterol was significantly decreased in animals treated with levan.	Yamamoto et al. 1999

Food	Probiotic	Levan was proven to enrich intestinal human microbiota.	Adamberg et al. 2015
	Prebiotic	Benefits to animal's intestinal microbiota were observed in comparison to prophylactic antibiotics.	Li e Kim 2013
	Shelf life	Levan was able to form a microgel with hydrocolloid properties resulting in a softer bread.	Jakob et al. 2012

Table 1. Scientific articles showing levan's potential to different application areas.

Source: Authors (2018).

Segment	Application	Description	Reference
Cosmetics	Bleacher	Japanese patent conceded showing levan could be used to inhibit melanin production through significative lowering of tirosin activity.	Masayo e Takayuki 2007
Medicine	Antioxidant	Worldwide patent requested for the use of a combination of levan with ascorbic acid in order to generate a compound of high oxidative stability.	Kim et al. 2011
Food	Functional yogurt	Patent requested describing levan yogurt as a functional food.	Xiao; Feng; Lu 2014
	Fat substitute	European patent conceded to the application of levan in lactic products in substitution to the fat percentage.	Booten; de Soete; Frippiat 2002
	Healthy candies	British patent approved to produce candies from fructans, including levan with digestive benefits.	Cordero 2010
Adhesive	Binder for pelleting	Worldwide patent that utilizes levan as a binder in the pelleting process of iron ore and agglutination for cement.	Madduri et al. 2017
	Cigarette adhesive	Chinese patent of an adhesive compound of pullulan and levan as a holder to cigarette.	Lei 2016

Table 2. Patents approved and requested for levan applications in different industrial segments.

Source: Authors (2018).

4 I INDUSTRIAL PRODUCTION

Commercial production of polysaccharides is usually associated with culturing in bioreactors, in which the culture conditions can be standardized, controlled and monitored. As a result of these conditions, the synthesis of polysaccharide by microorganism sources, when compared to the one done by plants, have a lower production time and simpler extraction steps. (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; SEVIOUR et al., 2011).

The definition of a bioprocess in industrial scale usually depends on the performance of experiments in smaller scale. The challenge of scaling-up involves mass and energy transfer, which are indispensable to maintain homogeneity of the media, specially associated to the disponibility of nutrients and dissolved oxygen used for cell growth and removal of the heat generated by microbial metabolism. The fermentation efficiency is influenced by a wide

range of factors; from the right strain and components choice to possible alterations in the reactional media caused by accumulation of product (SHULER; KARGI, 2011; SEVIOUR, 2011).

Regarding levan production, according to Franken et al. (2013), the market remains unexplored due to the difficulty in developing a viable production method. Despite the known use as food additive in places like the United States, Europe and Japan, there are still limitations for industrial production and application of levan, with relies on its high cost and the lack of homogeneity in the recovering and purification steps (GUPTA et al., 2011, FREITAS; ALVES; REIS, 2014). Freitas, Alves e Reis (2011) emphasize the lack of market data referring to levan production, which points to the absence of a significative production of this exopolysaccharide in industrial and commercial scale.

The necessary downstream steps for recovery of levan are determined in accordance with the microorganism characteristics, physicochemical properties, desired purity degree and the desirable commercial application (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; SEVIOUR et al., 2011).

Considering that levan is an extracellular polysaccharide, the first downstream step consists in biomass removal from the culture media. The standardized unit operations appropriated to cell removal are: filtration, microfiltration and centrifugation, the first two relying on particle size differences and the last one on the density difference from the mix components (ARVIDSON; RINEHART; GADALA-MARIA, 2006; DORAN, 2012). The liquid fraction containing the product of interest proceed to the following purification steps. Biomass can be recycled back to the process or directly disposed (DORAN, 2012).

After biomass separation, the polysaccharide is precipitated by a water miscible solvent in which the product is insoluble (FREITAS; ALVES; REIS, 2011). According to Tomulescu et al. (2016), levan in insoluble in organic solvents such as methanol, ketone, ethanol, n-propanol, methylketone, isopropanol, ethyl lactate and toluene. Currently, precipitation is a challenge to economic viability of the process, because the solvent:levan ratio requires excessive expenses with solvent. The most used solvent for precipitation of levan is ethanol and the necessary amount of this solvent follows a ratio of 3 or 4:1 (ethanol:levan) (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016). Therefore, the possibility of recovering ethanol from the process is being investigated and could lower down the budget of the process.

Ultrafiltration or dialysis are needed for purification of levan. Ultrafiltration allows the separation on nanometric components and, because it is very selective for particle size, it results in a high purity degree for the final product. Contaminants can also be removed by dialysis, in which particles are separated by a diffusion membrane in concentration gradients (TERMIZI, 2006). Although these two methods are presented as efficient for levan purification, when it comes to industrial scale, the challenge relies on the viability of big size equipment's for the processes (ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016; SHIH et al., 2005, 2011)6.

After purification step, levan can go through a drying step. The choice of the drying method requires evaluation of costs and parameters of the process. As showed in Table 3, despite the advantage of utilizing low temperatures, since the process is based on sublimation of the sample in temperatures below 0 and with low pressure, avoiding thermal degradation of the polysaccharide, the energetic demand and the lack of homogeneity in high volumes make the drying process inviable to be applied to normal industrial volumes (PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY EUROPE, 2010). Other methods can be studied in order to turn the levan drying step possible, as shown in Table 3.

	Principle	**Advantages**	**Disadvantages**
Lyophilization	Freezing and sublimation (from gas to solid) of the product in pressure and temperature lower than the triple point (AGRAWAL et al., 2016).	Minimal degradation of the product (AGRAWAL et al., 2016).	High energetic waste, lack of homogeneity in large volumes (PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY EUROPE, 2010).
Spray Drying	Transformation of fluid into powder, by means of atomization by a hot gas flow (SOSNIK, SEREMETA, 2015).	Quick method and good control of the particles size (SOSNIK, SEREMETA, 2015).	High energetic waste, high maintenance cost and need for a carrier compound (EHOW UK, 2017; ÖNER; HERNÁNDEZ; COMBIE, 2016)
Oven	Removal of water by heating (CECCHI, 2003).	Relatively quick method (ANIL, KIM, VENKANTESAN, 2017).	Decomposition of the polysaccharide structure and hardening of its surface (ANIL, KIM, VENKANTESAN, 2017).

Table 3. Characteristics of some drying methods for polysaccharides.

Source: Authors (2018).

5 I ADHESIVES

5.1 Synthetical adhesives

The adhesive and sealants market represented, worldwide, a total of 49,50 billion dollars in 2016 (MARKETS AND MARKETS, 2017). The estimated worldwide consumption of adhesives is close to 14 million tons per year (CERESANA, 2017). These materials can be applied into many types of industry, as example of paper and pulp, building, wood, transportation, health and cosmetical, consumer goods and others (MARKETS AND MARKETS, 2017). According to market analysts, it is a growing sector, with expectations to have a Compound Annual Growth Rate (CAGR) close to 4-5% in 2016-2022 period and, according to Grace Matthews director in an interview to Coatings World magazine, the share of adhesives reaches up to 90%, while only 10% represents sealants, which differ from adhesives for being applied to simply seal one surface, while adhesives glue two surfaces

(COATINGS WORLD, 2016; TECHNAVIO, 2016; MARKETS AND MARKETS, 2017).

The employed technology for adhesive synthesis can vary between synthesis with water, with solvent, hot-melted or with reactive substances (MARKETS AND MARKETS, 2017). The water-based one is starting to gain space and replacing the solvent-based technologies, a tendency observed because of the concern of using more eco-friendly raw material and because they emit none or lesser amounts of VOCs (Volatile Organic Compounds) (TECHNAVIO, 2016; HENKEL). Moreover, most of the commercialized adhesive derive from non-renewable raw material, like polyvinyl acetate, which dominates de market, opoxy, polyurethane, formol formaldehyde and urea formaldehyde, all coming from petrochemical sources (PATEL; MATHIAS; MICHAUD, 2013). In this context, the demand for bioadhesives is emerging since products that don't damage the environment are gaining space and people are becoming aware about the adverse effects of some synthetic materials (NASDAQ, 2018; TRANSPARENCY MARKET SHARE, 2018).

5.2 Bioadhesives

Biopolymers can have properties useful for the developing of bioadhesives, because some have a high adhesion strength. Also, these materials meet the market tendencies, in a way that they not only reduce the use of VOCs and toxic compounds and of petrochemical sources, but also that their products cause less environmental impact (SMITH; CALLOW, 2006). For these reasons, a growth in the use of these substances is expected in the bioadhesives market, with a Compound Annual Growth Rate (CAGR) close to 13%, considering the period of 2017-2022. A value close to 3 billion American dollars is expected to represent this segment in 2022 (RESEARCH AND MARKETS, 2017).

The most expressive markets for bioadhesives are paper and packaging, health, construction and personal care industries, highlighting the health sector, which has invested substantially in research and development for the fabrication of these products (GRAND VIEW RESEARCH, 2016).

Nowadays, bioadhesives from plants and animals are utilized, with plants being the most common ones. The main raw material derived from plants are starch, soy and corn, while the main ones derived from animals are bones, skin, hides, leather and other parts rich in collagen (GRAND VIEW RESEARCH, 2018). As an example of vegetable material, starch bioadhesive can be cited, which is a biodegradable, atoxic and of easy access material. Starch is capable of suffering alterations in its structure, such as gelatinization and crosslinking, giving it competitive adhesive properties when compared to synthetical adhesives, like the urea formaldehyde ones, largely utilized in wood products (ZHAO et al., 2018). Another example is the chitosan bioadhesive, material that comes from the exoskeleton of Crustacea. Its adhesive property has been proved, as well as antibacterial and hemostatic properties, being interesting for applications in wounds and burns, replacing the ones currently used for the same purpose, like cyanoacrilates, that present certain

toxicity (HAAG, 2006; LU et al., 2018).

Adhesives are used in medical applications as implants, tissue glue, healing agents of wounds and in the fabrication of materials and equipments (GRAND VIEW RESEARCH, 2017). Through this branch, various requirements must be attended. Biocompatibility, non-toxicity, adhesion to organic and inorganic structures, compatibility with sterilization methods, non-inflammable and antimicrobial characteristics are essential for the success of the products (JEREMY COOLER, 2011).

Usually, conventional adhesives are not efficient to medical applications, especially the ones destined for internal use. This is due to the liberation of toxic products that compose these adhesives (BLOOD WEEKLY, 2013) and to biological incompatibility. Bioadhesives represent an alternative to overcome these types of problems, therefore, their investment among the health industry grows substantially, aiming their application in cirurgical instruments, curatives and equipments that may be in contact with the skin. The replacement of sutures for bioadhesives represents a major potential application, because it can lower the chance of infection and contamination, it is easier to handle when comparing to the synthetical threads and there is no need to remove the bioadhesive after closing the woung, as the material is biodegradable (HAAG, 2006). Additionally, some biopolymers, as is the case with levan, also present healing, anti-inflammatory and antibacterial properties (SEDGWICK et al., 1984; STURZOIU et al., 2011; GOMES et al., 2018; GRAND VIEW RESEARCH, 2018; XU et al., 2018).

When it comes to replacement of sutures, sulfated levan showed itself to be capable of elevate the resistance of chitosan and alginate films, besides elevating their adhesion strength (STURZOIU et al., 2011). *In vitro* studies of the proliferation of muscle cells adhered to the chitosan-alginate-levan film showed that the cells keep multiplying while bound to the film, proving its non-toxicity and good adhesion. This application shows one potential for utilization of biopolymers, such as levan, while also point a solution against the limitation of the resources currently applied in the medical environment (GOMES et al., 2018).

6 I CONCLUSION AND UPCOMING PERSPECTIVES

Levan presents promising biochemical characteristics for application in a wide range of industrial sectors. However, only a few researches and applications present this substance as a main component of their formula or study object. Despite that some scientific workpapers point to levan's anti-inflammatory and antimicrobial properties, these properties still need to be proved through clinical tests before the wide exploration of the biopolymer in medical applications. A challenge is also the dissemination of a process capable of overcoming the difficulties currently encountered in the large-scale production of levan.

REFERENCES

ADAMBERG, K. et al. Levan enhances associated growth of *Bacteroides, Escherichia*, *Streptococcus* and *Faecalibacterium* in fecal microbiota. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–18, 2015.

AGRAWAL, M. et al. (Ed.). Lyophilization Pushing the Limits for Pharmaceutical Biotechnology Products. **Vacuum Technology & Coating**, v. 17, p. 27-29, 2016

ANIL, S.; KIM, S.; VENKANTESAN, J. (Ed.). **Seaweed Polysaccharides: Isolation, Biological and Biomedical Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2017.

ARVIDSON, S. A.; RINEHART, B. T.; GADALA-MARIA, F. Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 2, p. 144–149, 2006.

BLOOD WEEKLY. Patent Issued for Oxidized Cationic Polysaccharide-Based Polymer Tissue Adhesive for Medical Use. **Academic OneFile**, 2013. Disponível em: <http://link.galegroup.com/apps/doc/A329213834/AONE?u=capes&sid=AONE&xid=2cba0d7d>. Acesso em: 17 mar. 2018.

BOOTEN, K.; DE SOETE J.; FRIPPIAT, A. **Fructan- and/or polydextrose-containing dairy powders, process for preparing same and their use**. EP n. 0821885A1, 31 jul. 1996, 4 fev.1998.

CAPUTI, L. et al. Biomolecular characterization of the levansucrase of *Erwinia amylovora*, a promising biocatalyst for the synthesis of fructooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 50, p. 12265–12273, 2013.

CECCHI, M. H. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2 ed. São Paulo: UNICAMP, 2003.

CERESANA. **Market Study: Adhesives - World.** 3rd ed. 2017. Disponível em: < https://www.ceresana.com/en/market-studies/industry/adhesives-world/ceresana-market-study-adhesives-world.html>. Acesso em: 18 mar. 2018.

CHOI, H. J. et al. Lactosucrose bioconversion from lactose and sucrose by whole cells of *Paenibacillus polymyxa* harboring levansucrase activity. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1876–1879, 2004.

CORDERO, M.L.B. **Confectionery composition**. GB n. 2430344B, 6 ago. 2005, 13 out. 2010.

COOLER, J. Advanced Adhesives for Medical Applications. **Medical Design Technology**, 2011. Disponível em: <https://www.mdtmag.com/article/2011/08/advanced-adhesives-medical-applications>. Acesso em: 18 mar. 2018.

CRUTZ, A. M. et al. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis:* An antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 1043–1050, 1990.

DOGSA, I. et al. Exopolymer Diversity and the Role of Levan in *Bacillus subtilis* Biofilms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 2–11, 2013.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**, 2. ed. New York: Academic Press, 2012. 450 p.

EHOW UK. Advantages & Disadvantages of Spray Drying, 2017. Disponível em: <http://www.ehow.co.uk/info_8666922_advantages-disadvantages-spray-drying.html>. Acesso em: 17 jun. 2018.

FRANKEN, J. et al. Biosynthesis of Levan, a Bacterial Extracellular Polysaccharide, in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–14, 2013.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388–398, 2011.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M., Bacterial Polysaccharides: Production and Applications in Cosmetic Industry. **Polysaccharides**, [s.l.], p.1-24, 2014.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674–1683, 2017.

GRAND VIEW RESEARCH. Bioadhesives Market Analysis by Source (Plant Based & Animal based), By Application (Packaging & Paper, Construction, Wood, Personal Care, Medical) And Segment Forecasts To 2022. **Market Research Report**, 2016. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bioadhesives-market>. Acesso em: 18 mar. 2018.

GOMES, T. D. et al. Acta Biomaterialia Adhesive free-standing multilayer films containing sulfated levan for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, p. 1–13, 2018.

GU, Y. et al. Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 10, p. 4163–4174, 2017.

GUPTA, S. K. et al. Microbial levan, an ideal prebiotic and immunonutrient in aquaculture. **World Aquaculture**, n. January, p. 61–64, 2011.

HAAG, A.P; SMITH, M. A. (Ed.); CALLOW, J. A. (Ed.). Mechanical Properties of Bacterial Exopolymeric Adhesives and their Commercial Development. **Biological Adhesives.** 2006.

HAN, Y. W.; WATSON, M. A. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, n. 3–4, p. 257–260, 1992.

HENKEL ADHESIVE MALAYASIA. **Water Based Adhesives**. Disponível em: <http://www.loctite.sg/water-based-adhesives-3367.htm>. Acesso em: 20 fev. 2018.

HOMANN, A.; BIEDENDIECK, R.; GÖTZE, S.; JAHN, D.; SEIBEL, J; Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. **Biochemical Journal**, v. 407, p. 189–198, 2007.

INTHANAVONG, L. et al. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1405–1415, 2013.

JAKOB, F. et al. Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1234–1242, 2013.

KIM, C.H., et al. Cosmeceutical properties of levan produced by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Cosmetic Science**, v. 56, p. 395–406, 2005.

KIM, et al. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology. **Beta-fructosyl-L-ascorbic acid and the preparation method thereof**. WO n. 2005026183A1, 24 mar. 2005, 26 abr. 2011.

KUMAR, S.; SHAH, A. K. Characterization of an adhesive molecule from *Bacillus megaterium* ADE-0-1. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 543–548, 2015.

LEI, Z. **Cigarette holder adhesive and preparation method thereof.** CN n. 104059560A. 6 nov. 2014, 25 mai. 2016.

LEITE, A.J., et al. Bioadhesive and bioactive methacrylated nanocomposite levan-based beads for bone tissue applications. In: 2nd International Conference on Biological and Biomimetic Adhesives, 2014, Istambul. **Congress Book**. Istambul: Marmara University, 2014. p. 85

LI, J.; KIM, I. H. Effects of levan-type fructan supplementation on growth performance, digestibility, blood profile, fecal microbiota, and immune responses after lipopolysaccharide challenge in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 11, p. 5336–5343, 2013.

LI, Y.; TRICCAS, J. A.; FERENCI, T. A novel levansucrase – levanase gene cluster in *Bacillus*. p. 203–208, 2006.

LU, M. et al. Fabrication of photo-crosslinkable glycol chitosan hydrogel as a tissue adhesive. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. November 2017, p. 668–674, 2018.

MADDURI, A. et al. **Enhanced binders for iron ore pelleting and cement adhesive materials.** WO n. 2017223082A1. 20 jul. 2016, 28 dez. 2017.

MARKETS AND MARKETS. Adhesives & Sealants Market by Technology (Water-based, Solvent-based, Hot-Melt, Reactive), Chemistry Type (PAE, PVA, VAE, EVA, SBS, Synthethic Rubber, Polyamide, Polyurethane, Epoxy, Cyanoacrylate), Application, and Region - Global Forecasts to 2021. 2017. Disponível em: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/adhesive-sealants-market-421.html>. Acesso em: 18 mar. 2018.

MASAYO, F., TAKAYUKI, T. **Beautifully whitening agent**. JP n. 2006052146A, 28 fev. 2006, 5 set. 2007.

MÉNDEZ-LORENZO, L., et al. Intrinsic levanase activity of *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB). **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–15, 2015.

MENÉNDEZ, C. et al. Transcriptional regulation and signal-peptide-dependent secretion of exolevanase (LsdB) in the endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 1782–1785, 2009.

MONTANA POLYSACCHARIDES CORP. **Your source of levan**. Disponível em: <http://www.polysaccharides.us/aboutlevan_safety.php>. Acesso em: 19 mar. 2018.

OH, J.S. et. al. The anti-obesity effects of the dietary combination of fermented red ginseng with levan in high fat diet mouse model. **Phytotherapy Research**. v. 28, p. 617–622, 2014.

ÖNER, E. T.; HERNÁNDEZ, L.; COMBIE, J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 827–844, 2016.

OZIMEK, L. K. et al. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyse processive and non-processive transglycosylation reactions. **Microbiology**, v. 152, n. 4, p. 1187–1196, 2006.

PATEL, A. K.; MATHIAS, J.-D.; MICHAUD, P. Polysaccharides as Adhesives. **Reviews of Adhesion and Adhesives**, v. 1, n. 3, p. 312–345, 2013.

PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY EUROPE. Designing an effective PAT-Driven scale-up of lyophilization processes. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/designing-effective-pat-driven-scale-lyophilization-processes>. Acesso em: 18 jun. 2018.

PIANOFORTE, K (Ed.). Adhesives and Sealants Market. **Andrew Hinz**: entrevista [set. 2016]. Entrevista concedida à **Coatings World**, 2016. Disponível em: <https://www.coatingsworld.com/issues/2016-11-01/view_features/adhesives-and-sealants-market->. Acesso em: 18/03/2018.

RAHN. **Cosmetics: Proteolea**®. Disponível em: <https://www.rahn-group.com/en/cosmetics/product/17/>. Acesso em: 17 abr. 2018.

RAHN. **Cosmetics: Slimexir**®. Disponível em: <https://www.rahn-group.com/en/cosmetics/product/21/>. Acesso em: 17 abr. 2018.

RESEARCH AND MARKETS. Bioadhesive Market: Global Industry Trends, Share, Size, Growth, Opportunity and Forecast 2017-2022. 2017. Disponível em: <https://www.researchandmarkets.com/research/35kvqr/bioadhesive>. Acesso em: 18 mar. 2018.

RUNYON, J. R. et al. Characterizing changes in levan physicochemical properties in different pH environments using asymmetric flow field-flow fractionation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 6, p. 1597–1605, 2014.

SEDGWICK, A. D. et al. The effects of levan on the acute inflammatory response. v. 65, n. 2, p. 215–222, 1984.

SEVIOUR, R. J. et al. Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 170–185, 2011.

SHIH, I. L. et al. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8211–8215, 2005.

SHIH, I. L. et al. Sequential production of two biopolymers-levan and poly-ε-lysine by microbial fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 4, p. 3966–3969, 2011.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. 2nd Ed. New York, 2001.

SOSNIK, A; SEREMETA, K.P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Sciences**, v. 223, p. 40-54, 2015.

SRIKANTH, R. et al. Review on production, characterization and applications of microbial levan. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 102–114, 2015.

STURZOIU, C. et al. *Zymomonas mobilis* Levan is Involved in Metalloproteinases Activation in Healing of Wounded and Burned Tissues. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, n. 1, p. 453–458, 2011.

TECHNAVIO. Global Adhesives and Sealants Market 2017-2021. 2017. Disponível em: <https://www.technavio.com/report/global-adhesives-and-sealants-market>. Acesso em: 20 mar. 2018.

TERMIZI, M. F. A. The effect of cleaning ultrafiltration membrane using different concentration of NaOH. Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, University Malaysia Pahang, 2006.

TRANSPARENCY MARKET REAEARCH. Bioadhesive Market (Source - Plant-based and Animal-based; End User - Paper and Packaging, Construction, Wood Works and Furniture, Medical, and Personal Care) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2016-2024. 2016. Disponível em: <https://www.transparencymarketresearch.com/bioadhesives-market.html>. Acesso em: 18 mar. 2018.

TOMULESCU, C. et al. Levan - a Mini Review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. XX, p. 309–320, 2016.

VAN HIJUM, S. A. F. T. Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 621–630, 2004.

WALDHERR, F. W.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. Genetic and functional characterization of

Lactobacillus panis levansucrase. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 4, p. 497–505, 2008.

WU, F. C.; CHOU, S. Z.; SHIH, I. L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 6, p. 846–853, 2013.

XIAO, M., FENG, F., LU, L. **Preparation method of levan-contained yogurt**. CN n. 103190478B. 9 abr. 2013, 23 jul. 2014.

YAMAMOTO, Y. et al. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, n. 1, p. 13–18, 1999.

XU, Y. et al. Chitin nanocrystal enhanced wet adhesion performance of mussel-inspired citrate-based soft-tissue adhesive. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. December 2017, p. 324–330, 2018.

ZHAO, X. et al. Environment-friendly urea-oxidized starch adhesive with zero. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. November 2017, p. 1112–1118, 2018.

CAPÍTULO 8

METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA O DIAGNÓSTICO DA ESTRUTURA DAS COMUNIDADES DE MELIPONÍNEOS (APIDAE; MELIPONINI) NA MATA ATLÂNTICA

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 01/02/2022

Marília Dantas e Silva
Docente de Biologia do IF Baiano, campus Governador Mangabeira. Doutora em Ecologia pela UFBA e membro do grupo de pesquisa GEMAS/IF Baiano.
http://lattes.cnpq.br/1163368552232979

RESUMO: A relação entre a heterogeneidade espacial e a diversidade de espécies na Mata Atlântica ainda é pouco conhecida, provavelmente porque resulta da influência conjunta da variação em diversos fatores. Os meliponíneos são abelhas eusociais, representando a maioria dos insetos visitantes de flores nos ecossistemas tropicais. O presente artigo pretende descrever três metodologias utilizadas para diagnosticar a estrutura das comunidades de meliponíneos na Mata Atlântica. Como as unidades reprodutivas dos meliponíneos são as colônias sociais, o censo de ninhos gera estimativas adequadas do tamanho efetivo das populações. A distribuição das colônias representa um reflexo da disponibilidade dos recursos utilizados por elas. Já o monitoramento de ninhos artificiais analisa, de forma indireta, as taxas de enxameagem relativa, longevidade das colônias e a diversidade local. E por fim o uso de iscas atrativas avalia a dinâmica de forrageio das espécies e suas interações. Essas metodologias contribuem de formas distintas para a análise da estrutura das comunidades de meliponíneos, sendo importante a utilização das três, na mesma área de estudo, para resultados mais satisfatórios. O conhecimento gerado através desses estudos é de extrema importância para ações voltadas para a conservação dos meliponíneos, educação ambiental além do incentivo a criação racional de espécies nativas.
PALAVRAS-CHAVE: abelhas sem ferrão, nidificação, forrageio.

METHODOLOGIES USED FOR THE DIAGNOSIS OF THE STRUCTURE OF MELIPONINE COMMUNITIES (APIDAE; MELIPONINI) IN THE ATLANTIC FOREST

ABSTRACT: The relationship between spatial heterogeneity and species diversity in the Atlantic Forest is still poorly understood, probably because it results from the joint influence of variation in several factors. Meliponines are eusocial bees, representing the majority of flower-visiting insects in tropical ecosystems. This article aims to describe three methodologies used to diagnose the structure of meliponine communities in the Atlantic Forest. As the reproductive units of the meliponines are the social colonies, the nest census generates adequate estimates of the effective size of the populations. The distribution of colonies represents a reflection of the availability of resources used by them. The monitoring of artificial nests, on the other hand, indirectly analyzes relative swarming rates, colony longevity and local diversity. Finally, the use of attractive baits evaluates the foraging dynamics of species and their interactions. These methodologies contribute in different ways to the analysis of the structure of meliponine

communities, being important to use all three, in the same study area, for more satisfactory results. The knowledge generated through these studies is extremely important for actions aimed at the conservation of meliponines, environmental education, in addition to encouraging the rational creation of native species.

KEYWORDS: stingless bees, nesting, foraging.

1 I INTRODUÇÃO

A MATA ATLÂNTICA

A relação entre a heterogeneidade espacial e a diversidade de espécies na Mata Atlântica ainda é pouco conhecida, provavelmente porque resulta da influência conjunta da variação em diversos fatores (TONHASCA, 2005). Aliada a alta diversidade alfa, com recordes de heterogeneidade local da flora arbórea, a Mata Atlântica também exibe altas taxas de substituição espacial de espécies, em alguns casos maiores do que aquelas observadas na Amazônia (POR, 1992; GUEDES et al. 2005).

Por outro lado, a fragmentação extensiva da Mata Atlântica já levou a uma perda de diversidade na escala da paisagem, pela ampliação da extensão de habitats antropizados e pelo favorecimento de determinadas estratégias ecológicas. Por exemplo, segundo Metzger (1999), paisagens espacialmente mais diversificadas favorecem o estabelecimento de espécies vegetais generalistas, com reflexos potencialmente amplos sobre a fauna. Com a homogeneização das condições de existência espera-se redução na diversidade, devido às rupturas nos mecanismos de regulação local e alteração nos processos em maior escala espacial e, por conseqüência, desestabilização dos tipos de comunidade que interagem na paisagem.

O estado avançado de fragmentação da Mata Atlântica vem acompanhado de profundas mudanças na diversidade de habitats na escala da paisagem, com efeitos importantes sobre a diversidade nos remanescentes florestados. Aliada à expansão dos habitats antropizados, há o problema da perda de conectividade ecológica. Modelos generalizados já permitem fazer projeções sobre efeitos da perda de habitat sobre a conectividade (HANSKI, 1999), mas estudos empíricos vêm demonstrando que as respostas dependem dos tipos e configuração de habitats em mosaico e dos grupos de organismos envolvidos. Com a expressiva redução de área dos habitats de floresta da Mata Atlântica há muita preocupação com a manutenção de processos ecológicos em maior escala espacial, como a dispersão de sementes e a polinização.

OS MELIPONÍNEOS

Um dos grupos de alta diversidade, e ampla distribuição entre os ambientes tropicais e subtropicais, são as abelhas nativas sem ferrão, os meliponíneos (Apidae; Meliponini) (MICHENER, 2000). Apresentam alta diversidade na Mata Atlântica em comparação à

outros Biomas (BIESMEIJER & SLAA, 2006), com grande dominância em visita às flores de espécies arbóreas (RAMALHO 2004; MONTEIRO & RAMALHO, 2010).

Os meliponíneos são abelhas “generalistas” quanto ao uso de substratos de nidificação e recursos alimentares, e são os principais consumidores de pólen das flores nos trópicos úmidos (ROUBIK 1993), alimento usado como fonte de proteína para produção intensa e contínua da prole. São reconhecidas cerca de 400 espécies e estima-se um número igual com novas espécies, distribuídas em aproximadamente 50 gêneros, das quais mais de 70% ocorrem apenas nas Américas (CAMARGO & PEDRO, 2007).

Suas colônias são perenes e apresentam, em geral, alta longevidade (ELTZ et al. 2003), e a sobrevivência das mesmas depende do sucesso de reposição contínua da enorme força de trabalho, representada muitas vezes por milhares de operárias que vivem poucos dias (NOGUEIRA-NETO, 1997). Embora cada espécie seja amplamente generalista na exploração das fontes florais de pólen e néctar, os meliponíneos podem apresentar especialização comportamental, isto é, constância e preferência florais (RAMALHO et al. 1994, 2007). Na Mata Atlântica, os Meliponini desempenham papel fundamental no sistema de polinização de árvores com floração em massa, de flores pequenas, hermafroditas, monóicas (MONTEIRO & RAMALHO, 2010). Essa relação ecológica envolve uma possível co-evolução difusa, com gradual substituição de outros polinizadores generalistas (RAMALHO, 2004).

É provável que haja restrições mais severas sobre o número de espécies de Meliponini nas comunidades ecológicas, dadas as altas demandas por alimento e altas taxas de reposição da biomassa colônial (KLEINERT et al. 2009). Estudos sobre densidade populacional de colônias de diferentes espécies sustentam essa premissa (HUBBELL & JOHNSON 1977; BATISTA et al. 2003; SILVA et al. 2013).

Além da oferta de alimento, a oferta de cavidades preexistentes para nidificação é um recurso chave (MARTINS et al. 2004). A diversidade de substratos de nidificação usados por essas abelhas pode ser grande (NOGUEIRA-NETO, 1997). Poucas espécies fazem ninhos aéreos, expostos ou parcialmente expostos, e a maioria depende de cavidades preexistentes, tais como ocos de árvores vivas ou mortas, solo próximo das raízes de árvores, interior de ninhos de outros insetos sociais, podendo ocupar também cavidades artificiais associadas às construções humanas (ROUBIK 1989; MICHENER, 2000; BATISTA et al. 2003; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013). A oferta de cavidades preexistentes é, portanto, um dos prováveis fatores reguladores da riqueza e diversidade de meliponíneos nas florestas tropicais, como a Mata Atlântica.

2 | DESENVOLVIMENTO

Principais metodologias para avaliar a estrutura das comunidades de

Meliponini na Mata Atlântica

O censo de ninhos

Como as unidades reprodutivas dos Meliponini são as colônias sociais, o censo de ninhos gera estimativas mais adequadas do tamanho efetivo das populações, da abundância relativa das espécies e da estrutura das comunidades ecológicas. Além disso, a distribuição das colônias em um determinado local representa um reflexo da distribuição dos recursos utilizados por elas, principalmente os substratos usados para nidificação, e das interações com outros indivíduos da mesma espécie, ou de espécies diferentes (KLEINERT, 2006).

A escolha de um local adequado para a construção do ninho é uma variável que influencia o sucesso ecológico das espécies de Meliponini, em um determinado habitat, pois o ninho é um local fixo e permanente, a partir do qual os indivíduos da colônia forrageiam e dispersam para formar novas colônias (HUBBELL & JOHNSON, 1977).

Uma análise da densidade de ninhos, aliada a informações complementares sobre as espécies de meliponíneos e sobre os substratos utilizados para nidificação, pode discriminar tendências gerais a serem aplicadas em uma discussão sobre o processo de escolha, empregado pelas espécies deste grupo (KLEINERT, 2006), além de permitir o desenvolvimento de modelos que avaliem os efeitos da redução e fragmentação de habitats (BREED et al., 1999), e também de gerar dados importantes para a conservação e manejo tanto dos fragmentos florestais quanto das próprias espécies de abelhas sem ferrão que atuam na polinização.

Segundo Roubik (1989) a oferta de cavidades preexistentes seria o fator limitante para a expansão populacional dos Meliponini, já que face à grande diversidade da flora tropical, haveria grande variedade de recursos florais disponíveis ao longo do ano, principalmente nos trópicos úmidos. A abundância e distribuição de ninhos deveriam ser reflexo da disponibilidade de substratos de nidificação e, dessa forma, as espécies que diversificaram os sítios de nidificação, construindo ninhos expostos por exemplo, também reduziram a sobreposição de nichos e a competição.

Ninhos-armadilha (ninhos artificiais)

Como a nidificação ocorre em cavidades preexistentes, outra forma de se medir a abundância e riqueza de espécies de Meliponini presentes em um determinado habitat, é através do uso de ninhos-armadilha para captura de novos enxames. Há técnicas simples de melhorar a atratividade de enxames para esse tipo de armadilha, que já são usadas também por meliponicultores, mediante o emprego de vários materiais (NOGUEIRA-NETO, 1997; MALKOWSKI, et al. 2006; OLIVEIRA et al. 2009; SILVA ET AL.,2014; GOUVÊA, 2016).

O monitoramento de ninhos armadilhas avalia, de forma indireta, as taxas de enxameagem relativa, a longevidade das colônias, a dinâmica temporal e, simultaneamente, a diversidade local dos Meliponini (OLIVEIRA et al., 2009; SILVA et al.,2014; SILVA et al.,2019). Os ninhos podem ser confeccionados com garrafas plásticas, de diferentes volumes, e cada armadilha deve ser banhada internamente por uma mistura de extrato de própolis de diferentes espécies de abelhas, para melhorar a atratividade, e as entradas (geralmente de tubo plástico) podem ser banhadas com cera.

Segundo FRANKIE *et al* (2002) em espécies de abelhas solitárias os ninhos armadilhas são largamente utilizados para estimar riqueza em espécies e tamanho de populações, analisar ciclos de vida, comportamento sazonal e preferências por substratos. Contudo poucas pesquisas foram realizadas com os meliponíneos utilizando este tipo de metodologia (SILVA et al., 2013; OLIVEIRA et al, 2013; GOUVÊA, 2016).

De uma forma geral observa-se uma baixa frequência de ocupação dos ninhos-armadilha pelos Meliponini nas florestas, e isso pode estar relacionada, em parte, à alta variedade de substratos de nidificação nestes tipos de habitats. Dessa forma as armadilhas acabariam competindo com as cavidades naturais, ao contrário do que ocorre em áreas antropizadas, que apresentam pouca oferta de substratos naturais (BATISTA et al 2003, SILVA et al 2013; SILVA et al., 2019). Além disso, variações mais rápidas na oferta de cavidades tenderiam a favorecer espécies com histórico de vida particular, que inclui alta taxa de enxameagem e comportamento generalista de nidificação.

Outros fatores podem influenciar a ocupação dos ninhos, como o volume e o número das armadilhas disponibilizadas no ambiente; a luz solar incidente nas armadilhas; o excesso de umidade no interior dos recipientes; o material utilizado para a confecção das armadilhas; a cor das armadilhas; atrativos adicionais (ex:cerume-cera e própolis) e a utilização dos ninhos artificiais por outros insetos, como vespas e formigas (OLIVEIRA et al., 2012; SILVA et al., 2014; GOUVÊA, 2016; SILVA et al.,2019).

Iscas atrativas (borrifo de água e mel)

Para avaliar os efeitos das variáveis sobre a partição espacial e temporal de alimento é possível utilizar como isca padronizada uma solução de água e mel, reconhecidamente um bom atrativo para abelhas Meliponini, e também uma alternativa para testes comparativos de forrageio (JOHNSON & HUBBELL 1974, 1975). A solução pode ser borrifada diretamente sobre a folhagem e é considerada uma técnica eficiente para atração de abelhas Meliponini em habitats de floresta tropical como a Mata Atlântica (BREED et al 1999; ELTZ 2004; SILVA et al 2008; MONTEIRO, 2014).

A isca padronizada (água: mel/2:1) pode ser borrifada sobre 1 m^2 de folhagem (entre 1-1,5 m acima do solo), em pontos diferentes da área de amostragem, a depender da pergunta do estudo. Essa solução permite avaliar a dinâmica de forrageio das espécies

e suas interações, podendo gerar previsões sobre a riqueza de espécies, que neste caso utilizam o mesmo recurso (BREED et al 1999; ELTZ et al 2002; SILVA et al., 2008; MONTEIRO, 2014;SILVA et al.,2019).

As iscas de mel já foram utilizadas como ferramenta de acesso à diversidade de abelhas sociais entre diferentes elementos da paisagem em alguns estudos na floresta tropical (LIOW et al., 2001; ELTZ, 2004; SILVA et al 2008; MONTEIRO, 2014). Através desta metodologia já foi possível detectar variações espaciais importantes, principalmente associados ao aumento da riqueza de espécies em habitats mais próximos aos remanescentes de florestas primária (LIOW et al., 2001).

Entretanto segundo Breed e colaboradores (1999) as iscas podem ser tendenciosas por atraírem facilmente espécies com forrageio mais generalizado, além disso eles argumentam que a variação na taxa evaporação de substâncias odoríferas com a temperatura poderiam produzir mudanças de atratividade das iscas. Ainda segundo esses autores, as preferências de forrageio pelos meliponíneos podem mudar de acordo com a necessidade da colônia ou da disponibilidade dos recursos naturais.

Eltz (2004) argumentou ainda que o número de abelhas Meliponini em isca de mel deve ser maior em momentos que as colônias estão mais fortes e quando existem poucos recursos florais em oferta no habitat.

3 I CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos fatores ecológicos influenciam a riqueza e a ocorrência de espécies de Meliponini em áreas de floresta tropical, como a Mata Atlântica. A alteração na qualidade e tipos de substratos de nidificação disponíveis pode favorecer algumas espécies de abelhas, dependendo do seu nível de socialidade, grau de generalismo ou plasticidade comportamental. Pesquisas que utilizam o censo de ninhos, as armadilhas artificiais e as iscas atrativas contribuem de formas distintas para a análise da estrutura das comunidades de meliponíneos. Cada técnica tem vantagens e desvantagens, são influenciadas por diferentes fatores e podem acabar selecionando algumas espécies de meliponíneos em detrimento de outras. Assim é importante a utilização das três metodologias, na mesma área de estudo, para que os resultados sejam mais satisfatórios. Essas técnicas possibilitam a obtenção de informações ecológicas importantes, como dados sobre a riqueza de espécies e abundância de ninhos, que podem contribuir para a elaboração de planos de manejo e monitoramento de áreas naturais, além de ações voltadas para a conservação dos meliponíneos, educação ambiental e incentivo a criação racional de espécies nativas.

REFERÊNCIAS

BATISTA, M.A.; RAMALHO, M. & SOARES, A.E.E. Nesting sites and abundance of Meliponini (hymenoptera: Apidae) in heterogeneous habitats of the atlantic rain forest, Bahia, Brazil. Lundiana, v. 4, p. 19-23. 2003.

BREED, M.D.; MCGLYNN, T.P.; SANCTUARY, M.D.; STOCKER, E.M.; CRUZ, R. (1999) Distribution and abundance of colonies of selected meliponine species in a Costa Rican tropical wet forest. Journal of Tropical Ecology 15(6):765-777.

CAMARGO, J. M. F. & PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) inthe Neotropical Region. 2007.

ELTZ, T.; BRÜHL, C. A.; KAARS, S. V.; LINSENMAIR, K. E. Determinants of stingless bee nest density in lowland dipterocarp forests of Sabah, Malaysia. Oecologia, v. 131, p. 27-34. 2002.

ELTZ, T.; C.A. BRÜHL; Z. IMIYABIR & K.E. LINSENMAIR. Nesting and nest trees of stingless bees (Apidae: Meliponini) in lowland dipterocar forests in Sabah, Malaysia, with implications for forest management. For. Ecol. Manag. 172: 301-313. 2003.

Eltz T (2004) Spatio-Temporal variation o Apine bees attraction to honey baits in Bornean Forests. Journal of Tropical Ecology. 20:317-324.

FRANKIE, G. W. (2002). "Monitoring: An Essential Tool in Bee Ecology and Conservation." *Pollinating Bees - The Conservation Link Between Agriculture and Nature* (June 2016):187–98.

GALETTI, M.; DONATTI, C. ; PIRES, A. ; GUIMARÃES JR, P. ; JORDANO, P. Seed survival and dispersal of an endemic Atlantic forest palm: the combined effects of defaunation and forest fragmentation. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 151, p. 141-149, 2006.

GOUVÊA, P.C.L. Efeito de massa de *Tetragonisca angustula* sobre a metacomunidade de Meliponini (Hymenoptera, Apidae) em mosaico de floresta-silvicultura. 2016. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento. Universidade Federal da Bahia.55p.

GUEDES, M.L.S.; BATISTA, M.A.; RAMALHO, M.; BASTOS, H. L.; SILVA, E. M. Breve incursão sobre a Biodiversidade da Mata Atlântica. In: FRANKE, C. R.; ROCHA, P. L. B.; KLEIN, W.; GOMES, S. L. (Org.). Mata Atlântica e Biodiversidade. 1 ed. Salvador: EDUFBA, v. , p. 39-92. 2005.

HANSKI, I. Metapopulation ecology. Oxford University Press, New York. Oxford, United Kingdom. p.309. 1999.

HUBBELL, S.P. & L.K. JOHNSON. Competition and Nest Spacing in a Tropical Stingless Bee Community. Ecology. 58: p.950-963. 1977.

Johnson LK, Hubbell SP (1974) Aggression and competition among stingless bees: field studies. Ecology. 55:120-127.

Johnson LK, Hubbell SP (1975) Contrasting foraging strategies and coexistence of two bee species on a single resource. Ecology. 56:1398-1406.

KLEINERT, A. M. P.; RAMALHO, M.; LAURINO, M. C.; RIBEIRO, M.F. IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.Abelhas Sociais (Meliponini, Apinini, Bombini). In: Antônio R. Panizzi & José R. P. Parra. (Org.). Bioecologia e Nutrição de Insetos. Base para o Manejo Integrado de Pragas. Brasilia: Embrapa Informação Tecnológica, p. 371-424. 2009.

KLEINERT, A.M.P. Demografia de ninhos de meliponíneos em biomas neotropicais. São Paulo, SP, 93p. 2006. Originalmente apresentada como Tese de Livre Docência.Universidade de São Paulo. 2006.

LIOW, L. H., SODHI, N. S. & ELMQVIST, T. Bee diversity along a disturbance gradient in tropical lowland forests of south-east Asia. *Journal of Applied Ecology* 38:180–192. 2001.

MALKOWSKI, S.R.; FARAJ, B.H. & SCHWARTZ-FILHO, D.L. Eficiência de garrafas-iscas na captura de enxames de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (Hymenoptera, Apidae). In: DO 16º. CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA E 2º. CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA. Anais. Aracaju: 2006. 1 CD Rom.

MARTINS, C. F.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; KOEDAM D.; IMPERATRIZ11

FONSECA, V. L. Espécies arbóreas utilizadas para nidificação por abelhas sem ferrão na caatinga (Seridó, PB; João Câmara, RN). Biota Neotropica, v. 4(2), p.1-8. 2004.

METZGER, J. P. Estrutura da paisagem e fragmentação: analise bibliográfica. Anais da academia brasileira de ciencias (an. acad. bras. cienc.) v. 71 (1), n. 3, p. 445-463. 1999.

MICHENER, C.D. The bees of the World. Baltimore, Johns Hopkins University: 2000. 913p.

MONTEIRO, D & RAMALHO, M. Abelhas Generalistas (Meliponini) e Sucesso Reprodutivo de Árvores com Florada em Massa de *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr., (Fabales-Mimosaceae) na Mata Atlântica (Bahia). Neotropical Entomology, v. 39, p. 34-41. 2010.

MONTEIRO, D. Dinâmica espaço-temporal na partição de recursos por abelhas meliponini (hymenoptera, apidae) na Mata Atlântica – Ba. Tese. Doutorado em Ecologia, Universidade Federal da Bahia. 2014.

NOGUEIRA NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 445p.

OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, C; SILVA,R. A. O; SOARES, A. E. E & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Como obter enxames de abelhas sem ferrão na natureza? Mensagem Doce,v.100, p-34-39. 2009.

POR, F. D. Sooretama: the Atlantic rain forest of Brazil. 1ª edição. The Hague: SPB Academic Pub. 130 p. 1992.

RAMALHO, M.; GIANNINI, T.C.; MALAGODI-BRAGA, K.S. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Pollen harvest by stingless bee foragers (Hymenoptera, Apidae, Meliponinie). Grana, v.33, p.239-244. 1994.

RAMALHO, M. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. Acta bot. Bras, v.18, n.1, p.37-47. 2004.

RAMALHO, M. & BATISTA, M.A. Polinização na Mata Atlântica: perspectiva ecológica da fragmentação. In: C.R.FRANKE, P.L.B.DA ROCHA, W.KLEIN & S..L.GOMES (Orgs.). Mata Atlântica e biodiversidade. Salvador: Edufba, 2005. p. 93-142.

RAMALHO M.; SILVA, M. D.; CARVALHO, C.A.L. Dinâmica de uso de fontes de pólen por *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera, Apidae): Uma Análise Comparativa com *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), no Domínio Tropical Atlântico. Neotropical Entomology, v. 36, p. 38-45. 2007.

ROUBIK, D.M. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press, 1989. 514p.

ROUBIK, D.W. Tropical pollinators in the Canopy and Understory: Field data theory for stratum "preferences". Journal of Insect Behavior, 6: 659-673. 1993.

SILVA MD, RAMALHO M, FLORENCE CT, GOUVÊA PCL, OLIVEIRA JPL, MONTEIRO D, ROSA JF, ALMEIDA ME (2008) Heterogeneidade espacial e diversidade de abelhas Meliponini na Mata Atlântica (RPPN da Michelin, Bahia). Sitientibus Série Ciências Biológicas. 8:298-301.

SILVA MD, RAMALHO M, ROSA JF (2011) Por que *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera:Apidae) forrageia sob alta umidade relativa? Iheringia. 1:131-137.

SILVA, M. D., MONTEIRO, D., SILVA, M., OLIVEIRA, R. O., QUEIROZ, M. V. M., & SANTOS, J. F. (2012). Padrão de distribuição espacial de ninhos de Meliponini (Hymenoptera: Apidae) em função da disponibilidade de recursos para nidificação em um fragmento de Mata Atlântica em Salvador, Bahia, Brasil. Magistra, 24, 91-98.

SILVA MD, RAMALHO M, MONTEIRO D (2013) Diversity and habitat use by stingless bees (Apidae) in the Brazilian Atlantic Forest. Apidologie. 44:699-707.

SILVA MD, RAMALHO M, MONTEIRO D (2014) Communities of Social Bees (Apidae: Meliponini) in Trap-Nests: the Spatial Dynamics of Reproduction in an Area of Atlantic Forest. Neotrop Entomol. 43:307-313.

SILVA MD, RAMALHO M (2014) Nesting Trees to Meliponini (Apidae) in the Atlantic Rain Forest (Brazil): Availability or Selectivity? Sociobiology, in press.

TAURA, H. M.; LAROCA, S. Abelhas altamente sociais (Apidae) de uma área restrita em Curitiba (Brasil): Distribuição dos ninhos e abundância relativa. Acta. Biol, v. 20, p. 85-101. 1991.

TONHASCA J.R. A ecologia e história natural da mata atlântica. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2005. 197p.

WILLE A (1962) A technique for collecting stingless bees under jungle conditions. *Insectes Sociaux* 9:291-293.

CAPÍTULO 9

OCORRÊNCIA DE *Bemisia tabaci* NA CULTURA DA VIDEIRA NO NORDESTE

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 11/02/2022

Vanessa Gomes Amaral Almeida
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0001-5641-3654

Nayana Bruschi Infante
Universidade Federal de Alagoas – UFAL
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0003-1387-4658

Willams Alves da Silva
Universidade Federal do Ceará – UFC
Fortaleza - CE
https://orcid.org/0000-0002-4603-3049

Marlon Claudener dos Santos Dantas
Universidade Federal de Sergipe- UFS
São Cristóvão - Sergipe
https://orcid.org/0000-0003-3827-4448

Pedro Victor da Rocha Noé
Centro Universitário CESMAC
Maceió – AL
https://orcid.org/0000-0002-7574-1765

Isabela Malta Maranhão
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0002-6867-8892

Kayo Costa Alves
Centro Universitário CESMAC
Maceió – AL
https://orcid.org/0000-0002-7788-820X

Juliana de Paula dos Santos Silva
Centro Universitário CESMAC
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0001-6782-2664

Janayze Suéllen de Lima Mendes Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
Recife- PE
https://orcid.org/0000-0001-7496-8207

Mary Anne Medeiros Bandeira
Universidade Federal do Ceará – UFC
Fortaleza - CE
https://orcid.org/0000-0003-0550-8308

Sônia Pereira Leite
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE
Recife- PE
https://orcid.org/000-0002-0634-9735

Kristiana Cerqueira Mousinho
Centro Universitário CESMAC e Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL
Maceió - AL
https://orcid.org/0000-0003-0985-3336

RESUMO: A cultura da uva pode ser acometida por problemas que podem interferir diretamente na sua produtividade, como a ocorrência de pragas, destacando-ese a mosca-branca *Bemisia tabaci* biótipo B (*Bemisia argentifolii*) (Hemiptera: Aleyrodidae), cuja quantificação das perdas ocasionadas pelo inseto ainda não foi relatada. Todavia, em função do do grande número de hospedeiros colonizados pela mosca-branca, e

da importância da cultura para região, esta praga pode apresentar sérios danos à viticultura. Desta forma, a seguinte pesquisa tem por objetivo descrever a ocorrência de *Bemisia* tabaci na cultura da videira no nordeste. Trata-se de uma revisão narrativa da literatura. A fundamentação teórica do estudo incluiu pesquisa em bases eletrônicas de dados: Center for Biotechnology Information/U.S*, Scielo, Medline, Lilacs, Pubmed*. As palavras-chaves utilizadas foram: *Bemisia argentifolii*, *Vitis vinífera* e cultivars. Buscaram-se os textos que se encontravam disponíveis na íntegra, publicados entre os anos de 2002 a 2021, escritos em português e inglês. Os resultados apontam que a mosca-branca (*Bemisia* spp.) é um inseto em particular, de ampla recorrência que proporciona problemas para as culturas haja vista que seu ataque pode resultar em danos de elevadas dimensões. Neste sentido o controle de vírus em videira necessita ser preventivo. No caso das viroses, para a sugestão adequada de medidas de controle é indispensável a identificação precisa do agente causal por meio de um ou mais testes. Portanto, no submédio do Vale do São Francisco, o sintoma mais freqüentemente observado pela presença da praga em videira, até o momento, é a presença de uma substância açucarada, que favorece o desenvolvimento de fumagina (Fungo) nas folhas e nos frutos, tendo como consequência a redução do processo fotossintético das plantas e alteração na qualidade dos frutos.
PALAVRAS-CHAVE: *Bemisia argentifolii*. *Vitis vinífera*. Cultivares.

OCCURRENCE OF *Bemisia tabaci* IN THE VINE CROP IN THE NORTHEAST

ABSTRACT: The grape crop can be affected by problems that can directly interfere with its productivity, such as the occurrence of pests, especially the whitefly Bemisia tabaci biotype B (Bemisia argentifolii) (Hemiptera: Aleyrodidae), whose quantification of losses caused by the insect has not yet been reported. However, due to the large number of hosts colonized by the whitefly, and the importance of the culture to the region, this pest can cause serious damage to viticulture. In this way, the following research aims to describe the occurrence of Bemisia tabaci in the vine culture in the northeast. This is a narrative review of the literature. The theoretical foundation of the study included research in electronic databases: Center for Biotechnology Information/U.S, Scielo, Medline, Lilacs, Pubmed. The keywords used were: Bemisia argentifolii, Vitis vinífera and cultivars. We searched for texts that were available in full, published between the years 2002 to 2021, written in Portuguese and English. The results indicate that the whitefly (Bemisia spp.) is an insect, with a wide recurrence that causes problems for crops, given that its attack can result in large-scale damage. In this sense, the control of viruses in vines needs to be preventive. In the case of viruses, for the adequate suggestion of control measures, the precise identification of the causal agent through one or more tests is essential. Therefore, in the submiddle of the São Francisco Valley, the symptom most frequently observed by the presence of the pest in vines, so far, is the presence of a sugary substance, which favors the development of sooty mold (Fungus) in the leaves and fruits, having as a consequence the reduction of the photosynthetic process of the plants and alteration in the quality of the fruits.
KEYWORDS: *Bemisia argentifolii*. *Vitis vinífera*. Cultivars.

1 | INTRODUÇÃO

A cultura da videira apresenta grande potencial na geração direta e indireta de empregos, tanto no seu cultivo como na indústria de processamento e em função do turismo que se encontra anexa à plantação. A viticultura no Nordeste teve um desenvolvimento notável no seu cultivo e aumento das safras nas últimas décadas, com realce específico para o suco de uva, frutas frescas, vinho e exportação de vinho espumante (TRINDADE; TREVISAN; CARVALHO, 2019).

A videira (Vitis spp.) Pertence à família Vitaceae, sendo as espécies botânicas *V. vinifera L. e V. labrusca L.* É uma planta que vem sendo cultivada há milênios em determinadas partes do mundo. Ressaltantes tanto por seus frutos, quanto pelos vinhos e sucos derivados deles. Incluso da espécie V. vinifera, a abundância selvagem qualificada na subespécie sylvestris, deu linhagem à uva cultivada pertencente à subespécie sativa. Por conseguinte, a espécie *V. labrusca,* originou-se, por hibridização, as cultivares aproveitadas como porta-enxerto ou como copa, podendo assinalar neste último caso, os híbridos americanos dos denominados franceses (BARBOSA et al., 2015).

As espécies botânicas *V. vinifera L. e V. labrusca L.* É uma cultura abundante, lígnea, decídua, que pode ter um ciclo de vida de vários séculos devido à sua capacidade regenerativa, dependendo de climas temperados. A videira precisa de um inverno suficiente em seu ciclo anual, durante o qual se prepara para entrar em estado de repouso. É possível em regiões tropicais e equatoriais cultivar a videira utilizando-se técnicas especiais de poda e tratamento químico capaz de anular o estado de dormência da gema (BIELZA et al., 2019).

Em 2012, destacaram-se os produtores mundiais de uva, sendo a China o maior produtor (9.699.267 toneladas), os Estados Unidos, o segundo maior produtor (6.661.820 toneladas), seguido pela Itália (5.819.010 toneladas), França (5.338.512 toneladas), Espanha (5.238.300 toneladas) e Turquia (4.275.659 toneladas). O Brasil ocupa a 13ª posição com uma produção registrada de 1.514.768 toneladas (BIELZA et al., 2019).

O cultivo da videira brasileira teve início em 1532 na província de São Vicente, atual estado de São Paulo (DE MORAES et al., 2017). No entanto, com a chegada de imigrantes italianos e o ressurgimento da viticultura no estado de São Paulo (BIELZA et al., 2019) e expansão, a cultura só ganhou importância social e econômica no século XIX (DOMINGOS, 2017). Recentemente, o estado contribuiu com uma média de 777.000 toneladas de uvas por ano, principalmente para a produção de vinho (DE MELLO, 2017).

No nordeste, o estado de Pernambuco possui atualmente dois polos vitivinícolas, o Vale do São Francisco e a Zona da Mata. Ambos têm amplo potencial de expansão de culturas. A área de produção da Zona da Mata, embora pequena e limitada à variedade Isabel cultivada no Nordeste para suco e uva de mesa, desempenha um papel socioeconômico admirável, assegurando o homem e proporcionando renda nas atividades

agrícolas. A produção de uvas oferece cerca de 10.000 variedades que, além de oferecerem infinitos perfis organolépticos de vinho, grande produção ou diversificação de qualidade de diferentes espécies vegetais (REGINA et al., 2006).

No entanto, essa situação favorável pode ser alterada pela ocorrência de doenças que podem causar danos de pequeno a grande porte, com impacto na produção e qualidade dos produtos, sendo as viroses uma das doenças mais danosas na viticultura no mundo (GILBERTSON et al., 2015).

Enquanto a incidência e as consequências do vírus são menos conhecidas na zona da mata e nos vinhedos semiáridos de Pernambuco, essa classe de patógenos é conhecida por ser comum e importante em videiras, pois são afetadas por causas de danos, como murcha de plantas ao longo dos anos e rendimentos em declínio, tornam a vinha economicamente inviável (DE MORAES et al., 2017). A particular categoria vitivinícola de Pernambuco impõe uma avaliação específica das consequências do vírus, uma vez que todas as informações disponíveis sobre o assunto em diferentes partes do mundo foram obtidas de plantações embarcadas em condições de manejo significativamente diferentes. Desta forma, a seguinte pesquisa tem por objetivo descrever a ocorrência de Bemisia tabaci na cultura da videira no nordeste.

2 | METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa da literatura. A fundamentação teórica do estudo incluiu pesquisa em bases eletrônicas de dados: Center for Biotechnology Information/U.S*,* *Scielo* (Scientific Electronic Library Online)*, Medline (*Literatura Internacional em Ciências da Saúde)*, Lilacs* (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências de Saúde)*, Pubmed* (National Library of Medicine). As palavras-chaves utilizadas foram: *Bemisia argentifolii*, *Vitis vinífera* e cultivars.

Buscaram-se os textos que se encontravam disponíveis na íntegra, publicados entre os anos de 2002 a 2021, os quais constituíram artigos originais e revisões sistemáticas da literatura. Como critérios de elegibilidade e inclusão dos artigos, analisaram-se a procedência da revista e indexação, estudos escritos em português e inglês.

3 | REVISÃO DA LITERATURA

Um estudo mostra que no nordeste do Brasil, as introduções simultâneas foram feitas no século 16 nos estados da Bahia e Pernambuco nas ilhas de Itaparica e Itamaraca, onde os vinhedos foram enriquecidos. O desenvolvimento da expressividade, até ser controlado pelos holandeses. O cultivo se estende desde o interior do litoral nordestino até as divisas do Agreste e do Sertão (semi-árido), estabelecendo-se em Petrolina/Juazeiro, onde vem sendo desenvolvido comercialmente desde a década de 1950. Os estados da

Bahia e Pernambuco começaram a exportar no início da década de 1990, com aumento significativo de terras cultiváveis e maior suporte técnico (PEREIRA et al., 2018).

Segundo dados do IBGE, em 2018, os vinhedos ocupavam uma área de 73.742 hectares, com uma produção anual de cerca de 1.592.242 toneladas. As regiões Sul e Nordeste do Brasil são as principais áreas de produção de uvas. Em 2016 essas duas regiões foram responsáveis por 53% e 41% da produção brasileira, respectivamente (DEBASTIANI et al., 2015; DE MELLO, 2017). Revelam que o Nordeste responde por cerca de 19,90% (282.199 t) do total e o Estado de Pernambuco capturou a maior produção da região com 228.727 t, permanecendo no comando.

A Bahia ficou em segundo lugar com 52.808 toneladas, e os dois estados de Pernambuco e Bahia juntos são, na verdade, a produção total do Nordeste do Brasil. A região Sul é a maior produtora, respondendo por cerca de 66,67% da produção (945.304 toneladas), representando os estados do Rio Grande do Sul (808.267 toneladas), Paraná (79.072 toneladas) e Santa Catarina (57.985 toneladas) (MELLO, 2017).

Os fitovírus são parasitas intracelulares obrigatórios e, uma vez que a compatibilidade com a planta é situada, se replicam apenas através da utilização dos constituintes químicos da hospedeira, infectando as células que compõem os diferentes tecidos, danificando a integridade do organismo infectado em todos os níveis. Em benefício disto, provocam várias alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, através da ativação e/ou bloqueio de algumas atividades celulares nas plantas infectadas (LI et al., 2021).

A mosca branca (Bemisia spp.) É um inseto em particular, de ampla recorrência proporciona grande gravidade, haja vista que seu ataque pode resultar em danos de elevada dimensão (GILBERTSON et al., 2015).

Trata-se de um inseto que se reproduz facilmente no ambiente, pois possui elevada gama de plantas hospedeiras. Assim ela sobrevive nas plantas hospedeiras e quando é feito o plantio do tomate ela infesta novamente a cultura (GILBERTSON et al., 2015).

Muitos fitovírus têm uma extensa gama de hospedeiros e podem ser capazes de acarretar doenças em diversas plantas de famílias botânicas não pertinentes. É relativamente comum nestes casos, que os sintomas modifiquem de acordo com o patossistema (LI et al., 2021).

Muitas das espécies de vírus detectadas em videiras não fazem sentido econômico. Foi confirmado nesta cultura ocorrer ocasionalmente em áreas restritas ou estar associado a infecção latente. Ambos são transmitidos assexuadamente (LI et al., 2021), e esses sintomas geralmente passam despercebidos pelos viticultores, confundindo-se visualmente com adulteração causada por deficiências nutricionais ou infecção por outros patógenos, que podem variar com as condições ambientais, estádio fenológico da planta, fertilidade do solo e, principalmente, dependendo da combinação: cultivar e/ou espécie hospedeira e cepa e/ou espécie de vírus (LI et al., 2021).

Cerca de 65 espécies virais já constituíram descritas em videiras. Isto simula o

maior número de patógenos intracelular descobertos em uma única cultura (MARTELLI, 2014), com evidência para as seguintes famílias e seus gêneros: Betaflexiviridae (Vitivirus); Bromoviridae (Alfamovirus, Cucumovirus e Irlavirus); Bunyaviridae (Tospovirus); Closteroviridae (Closterovirus, Ampelovirus Alfaflexiviridae (Potexvirus, Foveavirus e Trichovirus); - subgrupos I e II e Velarivirus); Caulimoviridae (Badnavirus); Geminiviridae (gênero não determinado); Potyviridae (Potyvirus); Secoviridae (Fabavirus, Nepovirus – subgrupos A, B, C e não classificado); Tymoviridae (Maculavirus, Marafivirus); Tombusviridae (Carmovirus, Necrovirus, Tombusvirus); Virgaviridae (Tobamovirus); Pospiviroidae (Apscaviroid, Hostuviroid e Pospiviroid) e algumas com a classificação axonômica não determinada (n.d) pelo ICTV (Idaeovirus, Sobemovirus, RNA satélite – subgrupo I e n.d.) (CUTHBERTSON; VÄNNINEN, 2015).

Para o controle químico da mosca-branca, Barbosa et al., (2002), avaliaram a eficiência de produtos no controle de ninfas em videira e constaram que os melhores tratamentos em ordem decrescente foram: buprofezin (90%), detergente neutro (78%), pyriproxyfen (75%), óleo mineral (66%) e Azadiracta indica (64%).

Neste sentido o controle de vírus em videira necessita ser preventivo, pois não existem competentes que possam ser usadas durante a plantação, como há diferentes tipos de fitopatógenos. No caso das viroses, para a sugestão adequada de medidas de controle é indispensável a identificação precisa do agente causal por meio de um ou mais testes. Pouco se sabe ainda, a respeito das espécies que compõem esse grupo de plantas e principalmente em relação a características moleculares e morfológicas das populações existentes. Ademais, as formas de controle dessas espécies são extremamente limitadas, o que necessita mais estudos visando desenvolvimento de alternativas de manejo que impeçam a morte dos hospedeiros (FIRDAUS et al., 2012).

Principais Cultivares do Nordeste BRS Lorena: Introduzida em 2001 pela Embrapa Uva e Vinho, a casta branca BRS Lorena é particularmente indicada para a produção de espumantes do tipo Asti e também como opção para a produção de vinhos calmos e aromáticos (RITSCHEL; SEBBEN, 2010).

É uma casta produtiva que deve ser rica em açúcar e relativamente elevada em acidez, proporcionando vinhos espumantes com sabores equilibrados e vinhos calmos. Malvasia Bianca x Seyval, que se originou de um híbrido, herdou deste último a resistência a doenças fúngicas, especialmente míldio e podridão de grupo. Além de estar bem adaptado às condições ambientais do sul do Brasil, também tem apresentado bom comportamento nas regiões central, oeste e nordeste do país (RITSCHEL; SEBBEN, 2010).

Isabel Precoce, clone de 'Isabel' selecionado pela Embrapa Uva e Vinho, foi apresentado em 2002 como uma nova variedade. Essa variedade de uva tinta é recomendada como substituto para a fabricação de vinho de mesa, suco de uva e como opção para consumo in natura (CAMARGO; MAIA, 2008).

Apresenta as características gerais de Isabel, mas amadurece mais cedo, com um

tempo de colheita estimado em cerca de 35 dias. Ao contrário da variedade Isabel, onde é comum haver bagas verdes espalhadas entre os cachos maduros, a 'Isabel Precoce' apresenta um grau de maturação uniforme. A área cultivada com 'Isabel Precoce' está crescendo no estado do Rio Grande do Sul, assim como novos centros de produção de vinho de mesa e sucos nas regiões central, oeste e nordeste do Brasil. É uma variedade adaptável (CAMARGO; MAIA, 2008).

4 I CONSIDERAÇOES FINAIS

Estudos mostram no submédio do Vale do São Francisco, o sintoma mais frequentemente observado pelo ataque da mosca-branca em videira, até o momento, é a presença de substância açucarada e o desenvolvimento de fumagina nas folhas e nos frutos, tendo como consequência a redução do processo fotossintético das plantas e alteração na qualidade dos frutos.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, F. R. et al. Efeito do controle químico da mosca-branca na incidência do vírus-do-mosaico-dourado e na produtividade do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 879-883, 2002.

BARBOSA, L.F. et al. First report of Bemisia tabaci Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science**, v. 71, n. 4, p. 501, 2015.

BIELZA, P. et al. Spiromesifen and spirotetramat resistance in field populations of Bemisia tabaci Gennadius in Spain. **Pest management science**, v. 75, n. 1, p. 45-52, 2019.

CAMARGO, U. A.; MAIA, J. D. G. Cultivares de uvas rústicas para regiões tropicais e subtropicais. **Embrapa Uva e Vinho-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2008.

CUTHBERTSON, A.G.S; VÄNNINEN, I. The importance of maintaining protected zone status against Bemisia tabaci. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 432-441, 2015.

DA SILVA, A.G. et al. Mosca-Branca, Bemisia tabaci (Genn.)(Hemiptera: Aleyrodidae) em feijoeiro: Características gerais, bioecologia e métodos de controle. **EntomoBrasilis**, v. 10, n. 1, p. 01-08, 2017.

DEBASTIANI, G. et al. Cultura da uva, produção e comercialização de vinhos no Brasil: origem, realidades e desafios. **Revista Cesumar–Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**, v. 20, n. 2, 2015.

DE MELLO, L. M. R. Panorama da produção de uvas e vinhos no Brasil. **Embrapa Uva e Vinho-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.

DE MORAES, L.A. et al. New invasion of Bemisia tabaci Mediterranean species in Brazil associated to ornamental plants. **Phytoparasitica**, v. 45, n. 4, p. 517-525, 2017.

DOMINGOS, G. M. Caracterização de resistência de genótipos de couve-de-folhas Brassica oleracea (L.) var. acephala a Bemisia tabaci biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). 2017.

FIRDAUS, S. et al. Resistance to Bemisia tabaci in tomato wild relatives. **Euphytica**, v. 187, n. 1, p. 31-45, 2012.

GILBERTSON, R. L. et al. Role of the insect supervectors Bemisia tabaci and Frankliniella occidentalis in the emergence and global spread of plant viruses. **Annual review of virology**, v. 2, p. 67-93, 2015.

HOROWITZ, A. R. et al. Insecticide resistance and its management in Bemisia tabaci species. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 3, p. 893-910, 2020.

LI, Y. et al. Bemisia tabaci on vegetables in the Southern United States: incidence, impact, and management. **Insects**, v. 12, n. 3, p. 198, 2021.

MELLO, L.M.R. de. Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícula Mundial - Panorama 2011. Bento Gonçalves: EMBRAPA/CNPUV, 2012. (Comunicado Técnico 116).

PEREIRA, J.M. et al. Levantamento populacional de Bemisia tabaci (Gennadius 1989) biótipo B e ocorrência natural de Encarsiaspp. na cultura da soja. **ENTOMOTROPICA**, v. 35, p. 1-9, 2018.

REGINA, M. A. et al. Implantação e manejo do vinhedo para produção de vinhos de qualidade. **Embrapa Uva e Vinho-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2006.

RITSCHEL, P. S.; SEBBEN, S.S. **Embrapa Uva e Vinho: novas cultivares brasileiras de uva**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010.

TRINDADE, T.D; TREVISAN, H; CARVALHO, A.G. Ocorrência de Bemisia tabaci Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) em quatro fragmentos de Mata Atlântica. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, 2019.

CAPÍTULO 10

DEMANDA DE CONSULTAS DERMATOLÓGICAS E A OCORRÊNCIA DE SARNA DEMODÉCICA E SARCÓPTICA DOS CÃES ATENDIDOS EM JARAGUÁ DO SUL, SANTA CATARINA, BRASIL

Data de aceite: 01/02/2022

Charlene Edianez Longhi
Acadêmica de Medicina Veterinária do Instituto Federal Catarinense
Campus Araquari, SC

Daniela Brecht
Médica Veterinária, Especialista – Hospital Veterinário Amizade
Jaraguá do Sul, SC.

Carlos Eduardo Nogueira Martins
Professor, Doutor – Curso de Medicina Veterinária – Instituto Federal Catarinense – Campus
Araquari, SC.

Marlise Pompeo Claus
Professora, Doutora – Curso de Medicina Veterinária – Instituto Federal Catarinense – Campus
Araquari, SC.

Viviane Milczewski
Professora, Doutora – Curso de Medicina Veterinária – Instituto Federal Catarinense – Campus
Araquari, SC

RESUMO: As dermatopatias são atualmente as doenças de importante ocorrência em cães e nessa esfera, as infestações pelos ácaros causadores da sarna demodécia (*Demodex canis*) e sarna sarcóptica (*Sarcoptes scabiei*) são frequentes na rotina clínica veterinária. O presente trabalho objetivou realizar um levantamento da demanda de consultas dermatológicas e da ocorrência das sarnas demodécica e sarcóptica dos cães atendidos em um hospital veterinário no município de Jaraguá do Sul em Santa Catarina. Relacionou-se a presença desses ácaros com o sexo, idade, tipo de pelo, grau de prurido e distribuição das lesões nos cães acometidos de setembro de 2016 até março de 2017. No período estudado foram realizadas 1.084 consultas dermatológicas, o que representou 10,41% do total de atendimentos do hospital. Foram observados 36 casos clínicos de sarna (3,32%), sendo 22 causados por *Demodex canis* e 14 relacionados ao *Sarcoptes scabiei*. Dos casos de demodicose, observou-se maior número de casos em cães de pelo curto ($p<0,01$) e o grau de prurido moderado foi predominante, seguido dos cães com grau de prurido intenso e leve. Em relação à escabiose, a ocorrência de prurido intenso foi superior comparado ao prurido moderado ($p<0,01$). Não se observou manifestação de prurido leve. Não houve diferença significativa na frequência de cães acometidos por *D. canis* com relação ao sexo, idade e gravidade das lesões, assim como não se observou diferença ($p>0,01$) com relação ao sexo, idade, tipo de pelo e distribuição das lesões na escabiose.

PALAVRAS-CHAVE: Dermatologia veterinária, demodicose canina, escabiose canina, zoonose, Santa Catarina.

DEMAND OF DERMATOLOGICAL CONSULTATIONS AND THE OCCURRENCE OF DEMODECTIC AND SARCOPTIC MANGE OF DOGS SEEN IN JARAGUÁ DO SUL, SANTA CATARINA, BRAZIL

ABSTRACT: Dermatopathies are currently the most important diseases in dogs and in this area, infestations caused by scabies mites (*Demodex canis*) and sarcoptic scabies (*Sarcoptes scabiei*) are common in the veterinary clinical routine. The objective of this study was to survey the demand for dermatological consultations and the occurrence of demodectic and sarcoptic herds of dogs seen at a veterinary hospital in the city of Jaraguá do Sul, Santa Catarina. The presence, sex, age, hair type, degree of pruritus and lesion distribution in dogs from September 2016 to March 2017 were related. During the study period, 1,084 dermatological consultations were performed, which represented 10.41% of the total number of hospital visits. Thirty-six clinical cases of scabies (3.32%) were observed, of which 22 were caused by *Demodex canis* and 14 were related to *Sarcoptes scabiei.* Of the cases of demodicosis, a greater number of cases were observed in short-haired dogs ($p<0.01$) and the degree of moderate pruritus was predominant, followed by dogs with intense and mild pruritus degree. In relation to scabies, the occurrence of intense pruritus was superior compared to moderate pruritus ($p<0.01$). There was no evidence of mild pruritus. There was no significant difference in the frequency of dogs affected by *D. canis* in relation to gender, age and severity of the lesions, nor was there a difference ($p>0.01$) regarding sex, age, hair type and distribution of lesions in sarcoptic scabies.
KEYWORDS: Veterinary dermatology, canine demodicosis, canine scabies, zoonosis, Santa Catarina.

INTRODUÇÃO

O mercado de produtos e serviços relacionados a animais de estimação é um dos setores da economia que tem ganhado atenção especial de novos empreendedores, pois vem crescendo significativamente no Brasil e vem atendendo um consumidor final cada vez mais exigente. Dessa forma, pode-se observar que os proprietários de pequenos animais estão mais preocupados com a saúde, bem-estar e consequentemente com as enfermidades que podem acometer os mesmos (1). Atualmente, as dermatopatias são consideradas as doenças de maior ocorrência nos cães, sendo que as dermatites parasitárias assumem papel de importância, não só pela magnitude de ocorrência, mas principalmente pelo potencial zoonótico inerente a algumas delas (2). Os relatos mais frequentes são de infestações pelos ácaros *Demodex canis* e *Sarcoptes scabiei* (3). A demodicose é uma doença parasitária inflamatória em cães, não contagiosa, sendo o ácaro *Demodex canis* um dos principais agentes etiológicos responsáveis. Caracteriza-se por lesões localizadas, que na maioria dos casos é autolimitante, ou generalizadas, que são consideradas mais graves podendo envolver infecção secundária por bactérias oportunistas (4). Algumas características de suscetibilidade dos cães a demodicose é a pré-disposição genética, estresse, desnutrição, traumatismo, estro, parto, lactação, parasitismo, vacinas e até mesmo doenças debilitantes

(5). Enquanto que a escabiose é uma zoonose desencadeada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei* var. *canis,* que causa escavações superficiais na pele (6). A transmissão se dá pelo contato do animal com outro animal ou humano sintomático ou ainda com ambiente contaminado, por isso deve-se tratar e isolar os animais positivos e contactantes, além de adotar medidas de higienização do ambiente com produtos acaricidas (7). O diagnóstico e tratamento em ambos os casos é de suma importância, além de medidas de manejo e profilaxia.

Sabendo da importância da demodicose e escabiose em cães, a pesquisa teve como objetivo realizar um levantamento da demanda de consultas dermatológicas relacionadas à presença de *D. canis e S. scabiei* em cães atendidos em um hospital veterinário no município de Jaraguá do Sul, Santa Catarina. A partir dessa análise levou-se em consideração as características dos animais e sua relação com os casos clínicos de demodicose e escabiose.

REVISÃO DA LITERATURA

Demodicose canina

A demodicose canina é uma dermatite parasitária causada pelo ácaro pertencente à família Demodicidae, espécie *Demodex canis.* Esse ácaro vive dentro do folículo piloso e glândulas sebáceas, onde se alimentam de células epiteliais. As fêmeas fazem a postura dos ovos e em poucos dias ocorre a eclosão das larvas. As larvas passam para a fase ninfal e quando adultos, copulam na superfície da pele (fase de contaminação). Após a cópula só voltam para o folículo piloso os machos e fêmeas fecundadas. O ciclo biológico dura entre 18 e 35 dias (8). O estabelecimento da doença está diretamente relacionado com distúrbios genéticos ou imunológicos já que é um ácaro comensal da microbiota cutânea do cão, sendo assim, a doença só ocorre quando o número de ácaros excede ao que é tolerado pelo sistema imune (9). O mecanismo imunopatológico exato de sua manifestação ainda é desconhecido, porém acredita-se que esta manifestação ocorre devido a uma predisposição genética individual de cada animal, sendo a inibição dos linfócitos T uma das possíveis causas, favorecendo a pele dos portadores ao crescimento do parasita (10). As formas de apresentação clínica da doença são: juvenil e adulta, assim como localizada ou generalizada. Na forma localizada os ácaros ocupam apenas áreas específicas do corpo e na forma generalizada a doença já se apresenta como uma dermatite crônica onde os ácaros cobrem grandes áreas do corpo (11). Os sinais clínicos são variáveis e geralmente são apresentados por áreas circunscritas de alopecia na cabeça e na parte inferior dos membros, formação de crostas, eritema e alopecia generalizada. Normalmente não há prurido (8). Não é uma doença contagiosa, possivelmente devida sua localização profunda na derme, exceto em casos de contato prolongado, como ocorre durante a amamentação, por isso a castração é recomendada nos animais positivos, principalmente nas fêmeas, pois a transmissão acontece com o contato direto da mãe com a ninhada ou entre a

própria ninhada nas primeiras 48-72 horas pós-parto (12). Outros fatores predisponentes são: estro, parto e lactação (5), já a transmissão intrauterina ou transplacentária não está confirmada (13).

Escabiose canina

A escabiose canina é uma dermatite parasitária causada por um ácaro pertencente à família Sarcoptidae, espécie *Sarcoptes scabiei* var. *canis.* Possui 0,2 a 0,5mm de tamanho. Em seu ciclo evolutivo passa pelas fases de ovo, larva, duas fases de ninfa, macho e fêmea imatura que se transforma em fêmea adulta após fertilização. Após a fertilização a fêmea escava galerias na epiderme e se nutre de linfa e ao escavar seu túnel, vai efetuando a postura dos ovos. O trajeto das galerias é reconhecido pelo aspecto irritativo e pelas excreções enegrecidas que a fêmea vai deixando. Os ovos dão nascimento a larvas em cinco dias. As larvas passam para a superfície da pele, onde procuram alimento e abrigo e passam por um processo de muda, surgindo as ninfas. Após o processo de muda, surgem os machos e as fêmeas imaturas e então ocorre a fertilização resultando em fêmeas adultas, que penetram na pele recomeçando o ciclo. O ciclo se completa em 10 a 20 dias (8). Os cães atingidos geralmente apresentam histórico prévio de serem oriundos de abrigos, terem contato com cães de rua ou de visitarem estabelecimentos de banho e tosa. Um sinal clínico clássico é o prurido intenso, pois os ácaros secretam substâncias alergênicas. As manifestações clínicas iniciam com lesões que costumam aparecer na cabeça podendo atingir todo o corpo, além da presença de pus, crostas e escamas, alopecia e engrossamento da pele (6).

Diagnóstico

Além do histórico e das manifestações clínicas a técnica de escolha para diagnóstico de ambas as sarnas é o exame parasitológico de raspado cutâneo, que é realizado pegando-se uma dobra de pele, aplicando-se uma gota de óleo mineral e raspando em ângulo reto com uma lâmina de bisturi, até o sangue capilar aparecer (14). A confirmação da doença é obtida pela presença do ácaro em qualquer fase de seu ciclo evolutivo. Mas, uma nova técnica foi descrita, a técnica de impressão em fita de acetato, um método sensível e menos traumático para o animal onde se utiliza uma fita de acetato transparente que é adicionada sobre o local da lesão e pressionada com os dedos polegar e indicador, com a finalidade de desalojar os ácaros para o exterior do folículo e incluí-los na fita. Após a pressão a fita é removida e colocada em uma lâmina de vidro para então ser analisada ao microscópio óptico (15). A técnica de impressão em fita de acetato foi superior quando comparada ao exame parasitológico de raspado cutâneo, tanto no diagnóstico da demodicose quanto da escabiose canina, sendo um método de diagnóstico barato, eficaz e seguro (16).

Tratamento

O tempo de tratamento da demodicose varia conforme a apresentação da doença, a forma localizada é de fácil tratamento, já a forma generalizada é de difícil e longo tratamento. A cura parasitológica é atingida quando o diagnóstico não revela mais ácaros em nenhum dos seus estágios de desenvolvimento e a cura definitiva só é obtida após um ano, onde o diagnóstico deve ser negativo 4 semanas após a cura parasitológica e depois a cada 3 meses até completar um ano (13). No caso da escabiose, o tratamento geralmente é mais rápido e simples que a demodicose. Deve-se apenas atentar-se ao tratamento ou isolamento dos contactantes a fim de evitar reinfecção que pode levar a uma doença pruriginosa crônica (6).

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi executado de setembro de 2016 até março de 2017 em um hospital veterinário de pequenos animais situado no município de Jaraguá do Sul, localizado na região sul do Brasil, norte do estado de Santa Catarina. O município compreende uma área territorial de 529,447 km², na latitude 26°29'10" sul e longitude 49°04'00" oeste, estando a uma altitude de 30 metros. O clima da cidade é subtropical, com temperatura média anual de 21°C. A população estimada é de 167.300 habitantes, em 2016 (17). O número de cães participantes decorreu conforme a demanda de atendimentos no período do experimento. Foi realizado o levantamento do número diário de consultas e vacinações, além do número diário de consultas dermatológicas. Todos os cães que tiveram o diagnóstico de sarna confirmado através da técnica de impressão em fita de acetato (15) foram incluídos no estudo e as informações como: sexo, idade, raça, tipo de pelo, caso inicial ou recidiva e a presença de contactantes foram solicitadas. Também foram coletadas as informações de localização das lesões e tratamento adotado, além do grau de prurido que foi avaliado em uma escala de 0 a 10 pelo próprio proprietário do cão e assim classificada como: leve (notas entre 0 e 3), moderado (notas entre 4 e 7) ou intenso (notas entre 8 e 10).

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado com auxílio do software estatístico R versão 3.2.2., onde se adotou o nível de significância de 1%. As características analisadas foram referentes ao sexo, faixa etária, pelagem, grau de prurido e distribuição das lesões em ambas as sarnas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de execução do trabalho foram realizados 10.423 atendimentos entre consultas e vacinações, sendo que 1.084 foram relacionados a consultas dermatológicas, representando 10,41% do total de atendimentos. Os cães diagnosticados com sarna representaram 3,32% (36 cães) dos casos dermatológicos, destes 61% (22 cães) foram

diagnosticados com sarna demodécica e 39% (14 cães) com sarna sarcóptica. Em estudo no município de Três Barras (18) observou-se que o número de casos de escabiose foi superior (88,9%) em relação ao número de casos de demodicose (11,1%). Em pesquisa no município de Lages (19), verificou-se que a porcentagem de cães com demodicose e escabiose foi semelhante (48,28%), além de um cão que apresentou concomitantemente as duas doenças (3,44%). Esta diferença apresentada entre o presente estudo e os acima relatados pode ter ocorrido por diferentes motivos. O fato da atual pesquisa ter sido realizada apenas com cães domiciliados e também provenientes de um hospital veterinário localizado em área de característica socioeconômica estável da cidade pode ter favorecido a prevenção de possíveis casos de escabiose. Muitos tutores utilizam medicamentos para prevenção de pulgas e carrapatos que também atuam em *S. scabiei* proporcionando prevenção ou até mesmo tratamento precoce da doença e evitando sua dispersão intensa.

A frequência de cães com demodicose segundo o sexo, faixa etária, pelagem, grau de prurido e distribuição das lesões são verificados na tabela 1. Não foi possível observar diferença significativa ($p>0,01$) entre a ocorrência de demodicose e o sexo, faixa etária e distribuição das lesões. A inexistência de predisposição sexual na demodicose já foi relatada em outros trabalhos e parece já ser de consenso entre os autores (20). Nos casos de lesões localizadas, 44,44% dos animais apresentaram lesões apenas em extremidades dos membros, seguida de 33,33% de casos de lesões apenas na cabeça, de 11,11% de lesões em cabeça e membros e ainda 11,11% de lesões no ventre.

Em relação ao tipo de pelagem e ao grau de prurido foi possível observar que cães com pelo curto foram mais predispostos a apresentar sinais clínicos ($p=0,009$). Em outro trabalho (20), os autores também observaram maior predisposição de cães de pelo curto para demodicose. Uma possível explicação para tal achado é de que as glândulas sebáceas de cães de pelagem longa são menos desenvolvidas do que em cães de pelagem curta, sendo assim, os cães de pelagem curta disponibilizam mais alimento ao ácaro, favorecendo seu desenvolvimento (21). Em relação ao grau de prurido, os cães com prurido moderado, foram predominantes ($p=0,007$), seguido dos cães com grau de prurido intenso e leve. A demodicose é uma doença que geralmente não manifesta prurido, porém, pode manifestar quando associada a algumas doenças primárias ou infecção bacteriana secundária (22). Tal achado possivelmente deve-se ao fato de que 76,93% dos animais do presente estudo, que manifestaram prurido moderado, apresentaram alguma doença primária que naturalmente já manifesta prurido ou infecção bacteriana secundária.

QUESITO AVALIADO	PARÂMETROS	P VALUE

Sexo	Macho	Fêmea	--------	0,394
	40,90% (9)	59,10% (13)		
Idade	> de 1 ano	< de 1 ano	--------	0,394
	40,90% (9)	59,10% (13)		
Distribuição das lesões	Localizada	Generalizada	--------	0,394
	40,10% (9)	59,10% (13)		
Pelagem	Curto	Longo	Arame	0,009
	63,63% (14)	27,27% (6)	9,10% (2)	
Grau prurido	Leve	Moderado	Intenso	0,007
	4,54% (1)	59,10% (13)	36,37%(8)	

Tabela 1. Frequência relativa (%) e absoluta de cães positivos para *Demodex canis* segundo o sexo, faixa etária, pelagem, grau de prurido e gravidade das lesões, Jaraguá do Sul – SC (set/2016 a mar/2017).

Com relação aos cães com demodicose, 54,55% dos casos estavam relacionados com cães de raça definida e 45,45% aos cães sem padrão racial definido. Os casos de recidiva foram representados por 36,37% dos cães e 63,63% dos casos foram manifestados pela primeira vez.

Os casos de escabiose (tabela 2) observados não tiveram relação com sexo, faixa etária ou tipo de pelagem, também não houve diferença significativa com relação a distribuição das lesões pelo corpo do cão (p>0,01). Dos animais que apresentaram lesões localizadas, 50% apresentaram-se em cabeça e membros e os demais 50% em ventre.

Já os diferentes graus de prurido, apresentaram frequência significativamente diferente entre os cães com escabiose (p=0,001). Não houve nenhum cão com manifestação de prurido leve e a ocorrência de prurido intenso foi superior ao comparar com o prurido moderado. Outros autores (6) também verificaram que o principal sinal clínico da escabiose é a manifestação de prurido, desencadeado por uma reação de hipersensibilidade devido a secreção de substâncias alergênicas produzidas pelo próprio ácaro.

QUESITO AVALIADO	PARÂMETROS			P VALUE
Sexo	Macho	Fêmea	--------	0,285
	64,30% (9)	37,70% (5)		
Idade	> de 1 ano	< de 1 ano	--------	0,285
	37,50% (5)	64,30% (9)		
Distribuição das lesões	Localizada	Generalizada	--------	0,109
	28,58% (4)	71,42% (10)		
Pelagem	Curto	Longo	Arame	0,071
	28,56% (4)	64,30% (9)	7,14% (1)	

Grau prurido	Leve	Moderado	Intenso	0,001
	0% (0)	14,28% (2)	85,72%(12)	

Tabela 2. Frequência relativa (%) e absoluta de cães positivos para *Sarcoptes scabiei* segundo o sexo, faixa etária, pelagem, grau de prurido e gravidade das lesões, Jaraguá do Sul – SC (set/2016 a mar/2017).

Dos animais com escabiose, 78,57% deles eram de raça definida e de todos os animais, 71,42% não tiveram contactantes sintomáticos, segundo os proprietários.

Tanto os casos de demodicose quanto escabiose foram tratados com doramectina[1*] ou fluralaner[2*] ou soralaner[3*]. Alguns casos de escabiose foram tratados com selamectina[4*]. Em casos de infecção bacteriana secundária além do tratamento da sarna também foi realizado antibioticoterapia.

CONCLUSÕES

A demodicose afetou com maior frequência cães de pelagem curta, além do grau de prurido moderado ter sido significativamente maior do que os graus leve ou grave. Nos casos de escabiose não houve relação dessa doença com o tipo de pelagem, sexo, idade e distribuição das lesões, porém nos casos levantados a condição de prurido grave foi significativamente maior. O estudo reforça a importância da dermatologia na rotina clínica veterinária, representando 10,41% do total de atendimentos no hospital estudado.

REFERÊNCIAS

1. ELIZEIRE, Mariane Bräscher. Expansão do mercado pet e a importância do marketing na medicina veterinária. 2013. 51 f. (Trabalho de conclusão em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

2. CHEE, J. H.; KWON, J. K.; CHO, H. S.; CHO, K. O.; LEE, Y. J. A Survey of Ectoparasite Infestations in Stray Dogs of Gwang-ju City, Republic of Korea. **Korean J Parasitol,** v. 46, n. 1, p. 23-27, 2008.

3. AUJA, R. S.; SINGLA, L. D.; JUYAL, P. D.; GUPTA, P. P. Prevalence and pathology mange-mite infestations in dogs. **J Vet Parasitol,** v. 14, n. 1, p. 45-49, 2000.

4. SANTAREM, V. Demodiciose canina: revisão. **Rev Clínica Vet,** n. 69, 2007, p. 86-95, 2007.

5. MUELLER, Ralf S. Treatment protocols for demodicosis: an evidence-based review. **Vet Dermatol,** v. 15, n. 2, p. 75-89, 2004.

6. HNILICA, K. A. Escabiose Canina (sarna satcóptica). In: HNILICA, K. A. **Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, 135p.

7. FERRARI, M. L. O. P.; PRADO, M. O.; SPIGOLON, Z.; PICCININ. A Sarna sarcóptica em cães. **Rev**

1 * Dectomaxâ - Zoetis
2 * Bravectoâ - MSD
3 * Simparicâ - Zoetis
4 * Revolutionâ - Zoetis

Cient Eletrônica Med Vet, n.10, 2008.

8. MONTEIRO, S. G. Astigmata – Sarnas. In: MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na medicina veterinária.** São Paulo: Roca, 2010, 32-49p.

9. DELAYTE, E. H.; OTSUKA, M.; LARSSON, C. E.; CASTRO, R. C. C. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicose canina generalizada. **Arq Bras Med Vet Zootec,** Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 31-38, 2006.

10. TIZARD, I. R. Immunity to parasites. In: TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction.** 6. Ed, Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. P. 280-294.

11. DeMANUELLE, T. C. Demodicose canina. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária – doenças do cão e do gato.** 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 2074.

12. GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. **SKIN DISEASES OF THE DOG AND CAT: Clinical and Histopathologic Diagnosis,** Oxford, 2005, Blackwell Science Ltd.

13. SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Parasitic Skin Diseases. Canine Demodicosis. In: Muller & Kirk's. **Small Animal Dermatology**. 6th Edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001, p. 457-474.

14. TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p. 119.

15. PEREIRA, A. V.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; CAMPOS, M. P.; FERREIRA, A. M. R. Comparison of acetate tape impression with squeezing versus skin scraping for the diagnosis of canine demodicosis. **Aust Vet J,** v. 90, n. 11, p. 480-450, 19 set. 2012.

16. PEREIRA, D. T.; CASTRO, I. J. M.; CENTENARO, V. B. Skin impression with acetate tape in *Demodex canis* and *Sarcoptes scabiei* var. *vulpes diagnosis*. **Arq Bras Med Vet Zootec,** v. 67, n. 1, p. 49-54, 2015.

17. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Santa Catarina >> Jaraguá do Sul. Disponível em: <http://cod.ibge.gov.br/8T0>. Acesso em 15 de mar. 2017.

18. PEDRASSANI, D.; CAMARGO, F. R.; CANTON, M.; SOCCOL, V. T. Prevalência de sarna em cães do Distrito de São Cristóvão, Três Barras/SC e uso de d-fenotrina no tratamento de cães com sarna sarcóptica. **Vet Foco,** v.6, n.1, p.29-38, 2008.

19. BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SOUZA, P.; RAMOS, B. C. Ectoparasitos em caninos do município de Lages, Santa Catarina, Brasil. **Rev Bras Parasitol Vet,** v. 12, n. 3, p. 95-98, 2003.

20. SILVA, L. V. A.; SANTANA, I. M.; ALVES, L. C.; FAUSTINO, M. A. G. Infecção por *Demodex canis* em cães dermatologicamente sadios e com dermatopatias, procedentes da região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Med Vet,** 2011, p. 1-6.

21. BAKER, K. P. Observations on demodectic mange in dogs. J. **Small Anim Pract**, v.9, p.621-625, 1968.

22. CASWEEL, J. L.; YAGER, J. A.; PARKER, W. M.; MOORE, P. F. A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. **Vet Pathol,** v.34, p.279-287, 1997.

CAPÍTULO 11

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA NAS CLÍNICAS E CENTRO CIRÚRGICO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM)

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 03/12/2021

Eduardo Aroucha Roland
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Discente do Curso de Odontologia
Manaus-Amazonas
http://lattes.cnpq.br/4761970189368814

Sônia Maria da Silva Carvalho
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas, Docente Associada IV e Chefe da Divisão de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas
Manaus-Amazonas
http://lattes.cnpq.br/7735595307702309

Maria Ivone Lopes da Silva
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Doutora em Ciências Biológicas (Botânica) pela Universidade de São Paulo, Docente Titular da Universidade Federal do Amazonas
Manaus-Amazonas
http://lattes.cnpq.br/4169112948312043

RESUMO: Os fungos anemófilos liberam no ambiente estruturas reprodutivas chamadas esporos, que ao serem transportados pelo ar, são capazes de propagar a espécie, ao encontrar um substrato viável. Com o objetivo de analisar a microbiota fúngica e a qualidade do ar dos ambientes clínico-cirúrgicos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), utilizou-se um método qualitativo de coleta desses fungos, por meio da deposição dos esporos em placas de Petri com meios de cultura, expostas nos locais por 20 minutos e após, incubadas à 25°C por 15 a 30 dias. Decorrido este período, as colônias foram contadas, descritas morfologicamente, repicadas e identificadas. Para avaliar a diversidade fúngica, optou-se por realizar duas coletas em períodos distintos, sendo a primeira na estação seca, em setembro de 2018, e a segunda na estação chuvosa, em fevereiro de 2019. Na primeira coleta houve um total de 196 colônias, sendo 122 (62,25%) classificadas como *Mycelia sterilia*, micélio estéril sem gênero e espécie específicas; dentre os identificados, os gêneros *Cladosporium sp* com 45 colônias (22,96%) e *Penicillium sp* com 20 (10,20%,) foram os mais prevalentes. Na segunda coleta houve uma redução do número de colônias para 126, sendo 83 (65,9%) classificadas como *Mycelia sterilia*, e dentre os identificados, os mais prevalentes foram os gêneros *Aspergillus sp* (17,4 %) com 22 colônias, sendo 11 da espécie *A. flavus*, e o gênero *Penicillium sp* com 5 colônias (3,9%). A pesquisa foi importante para ampliação dos estudos sobre fungos anemófilos e na sua repercussão nociva para saúde humana.

PALAVRAS-CHAVE: fungos, diversidade, repercussão, saúde.

CHARACTERIZATION OF THE FUNGAL MICROBIOTA IN THE CLINICS AND SURGICAL CENTER OF THE FACULTY OF DENTISTRY, FEDERAL UNIVERSITY OF AMAZONAS

ABSTRACT: Anemophilous fungi release reproductive structures known as spores into the environment, which when transported by the airflow, are capable of propagating the species when they find a viable substrate. Aiming to analyze the fungal microbiota and the air quality of the clinical-surgical environments of the Faculty of Dentistry of the Federal University of Amazonas (UFAM), we used a qualitative method to collect these fungi by depositing the spores in Petri dishes with culture media, exposed in the locations for 20 minutes, after which they were incubated at 25°C for 15 to 30 days. After this period, the colonies were counted, morphologically described, repotted and identified. In order to evaluate the fungal diversity, two collections were made in different periods, the first during the dry season in September 2018 and the second during the rainy season in February 2019. In the first collection there was a total of 196 colonies, however 122 (62.25%) could not be identified because they were Mycelia sterilia, sterile mycelium without any specified genus or species, however, among those identified, the genera Cladosporium sp with 45 colonies (22.96%) and Penicillium sp with 20 colonies (10.20%,) were the most prevalent. In the second collection, there was a reduction in the number of colonies to 126, of which 83 (65.9%) were classified as Mycelia sterilia, and, among those identified, the most prevalent were the genera Aspergillus sp (17.4%) with 22 colonies, 11 of which were of the species A. flavus, and the genus Penicillium sp with 5 colonies (3.9%). This research was important for the expansion to the study of anemophilic fungi and their harmful repercussion to human health.
KEYWORDS: fungi, diversity, repercussion, health

1 | INTRODUÇÃO

Os fungos são seres eucariontes, heterotróficos, uni ou pluricelulares, pertencentes ao reino Fungi. Estão extensamente distribuídos no meio ambiente, encontrando-os no ar, água, solo, animais domésticos e silvestres, excretas e em vários alimentos como produtos lácteos, bebidas e queijos. (LACAZ *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2021). Em ambientes internos, a qualidade do ar está se tornando interesse mundial, a medida em que a mudança do estilo de vida da população, ao frequentar, em boa parte da vida, ambientes climatizados artificialmente, aumenta. (ANTUNES *et al.*, 2021).

A formação da alta quantidade de propágulos, como esporos e micélio vegetativo, determinam a eficácia da disseminação dos fungos, sendo o ar atmosférico seu principal carreador, transportando-os a longas distâncias através do vento. Esses fungos que utilizam o ar como fonte de disseminação, são conhecidos como anemófilos. Estes possuem importância tanto por serem biodeteriorantes de diversos substratos, quanto por serem agentes causadores de alergias respiratórias tais como rinites alérgicas e asma brônquica. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

O desenvolvimento dos fungos é facilitado pelas condições climáticas nos trópicos, fazendo com que suas células, tais como esporos ou partículas de hifas, sejam transportados

para a atmosfera, tornando-se anemófilos, com potencial alergizante. (FONSECA e CONCEIÇÃO, 1977). Outros fatores também estão associados as concentrações e diversidade fúngicas no ar, como a estação do ano, temperatura, umidade relativa do ar, radiação solar, pressão barométrica e poeira domiciliar. (SILVA *et al.*, 2021).

A diversidade fúngica do ar varia em cada cidade ou região, podendo apresentar-se diferente ou semelhante, devido a dispersão desses microorganismos pelo ar atmosférico. A exposição do indivíduo a estes aeroalérgenos, pode desencadear processos alérgicos, principalmente respiratórios, onde o nível de importância médico-clínico, se deve à intensidade de exposições. Ainda que exista o conhecimento da associação entre fungos anemófilos e quadros de hipersensibilidade do trato respiratório, há a carência de publicações a respeito nas cidades brasileiras. (MEZZARI *et al.*, 2003).

Um ambiente contaminado pode desencadear a perda de produtividade decorrentes de sintomas como fadiga, sonolência, cansaço, fraqueza, apatia, náusea, coriza, tontura, dor de cabeça, dificuldade de concentração, urticária, irritação e secura na pele, falta de ar, irritação no nariz e na garganta, rinite alérgica, asma brônquica, entre outros. (LIMA M.L.F., LIMA J.S. e SILVA 2019).

Alguns destes estudos, demonstram que os fungos verificados no ar atmosférico são praticamente os mesmos encontrados na superfície corpórea do homem e de diversos animais. Fungos anemófilos também estão presentes nos ambientes internos e, geralmente, refletem a diversidade encontrada no ambiente externo, no entanto, a concentração de fungos presentes no ar do ambiente interno, não deve exceder ao do ambiente externo; exceto caso encontrem um meio adequado para reprodução e consequente colonização e multiplicação, levando ao aumento do número de fungos no ambiente interno; ou quando certa espécie suplanta as demais. Esses casos demonstram um desequilíbrio no ambiente interno e por isso há a necessidade em investigar e sanar a causa. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Com base na Resolução-RE Nº 9 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003), foram determinadas medidas de referência, para a manutenção da qualidade do ar, em ambientes internos climatizados de uso público e coletivo já existentes e aos que serão instalados. Existe, portanto, o Valor Máximo Recomendável (VMR) para contaminação microbiológica, devendo ser ≤ 750 ufc/m³ de fungos, para a relação I/E $\leq 1{,}5$; sendo I correspondente a quantidade de fungos presentes no ambiente interno e E a quantidade de fungos referentes ao ambiente externo. É necessário investigação caso os valores de fungos presentes em um ambiente interno, exceda os valores do VMR ou se a relação I/E for $>1{,}5$; a fim de solucionar os focos de contaminação. Foi também classificado como inadmissível a presença de fungos toxigênicos e patogênicos.

Segundo Sousa e Fortuna (2011), a profissão cirurgião-dentista possui certas atividades voltadas a excisão de tecidos contaminados, na presença de fluidos corporais (sangue e saliva), por meio de motores de alta rotação que contaminam o entorno com

aerossóis, espalhando gotículas que podem infectar equipamentos, o ar e acessórios, com microrganismos. Verificou-se que durante os atendimentos odontológicos, os níveis de contaminantes no ar aumentaram, mostrando, portanto, se tratar de uma área tanto contaminante como contaminada, principalmente devido a aerolização de materiais biológicos, como sangue e saliva, e aqueles com potenciais tóxicos.

Nesse sentido, Lacaz, *et al*. (2002), afirma que, o aumento de infecções oportunistas nosocomiais está relacionado com a evolução de tratamentos medicamentosos ou cirúrgicos em indivíduos imunocomprometidos por doenças infecciosas, em transplantados de maneira geral, pós-operatório de várias cirurgias cardíacas, neoplasias e hemopatias. Além disso, existem fungos consideravelmente relacionados com a alergia respiratória, sendo esses: os filamentosos, hialinos ou demácios e as leveduras.

Segundo a literatura, cerca de 1 bilhão de pessoas são acometidas por infecções fúngicas (superficiais, subcutâneas e invasivas) anualmente, sendo que cerca de 1,6 milhões de pacientes evoluem à óbito decorrente principalmente de micoses com comprometimento sistêmico. Nota-se que apesar da baixa incidência comparada a outras infecções, ainda assim, exibem percentuais de mortalidade acentuadas, acometendo principalmente pacientes com grave deterioração imunológica. (NEUFELD, 2020). Cerca de 4 milhões de pessoas, por ano, são afetadas por infecções fúngicas no Brasil. (ANTUNES *et al*., 2021).

Ainda se tem empecilho para determinar a relevância de fungos alergizantes em quadros de rinite e asma alérgicas, grande parte em consequência da incompreensão da microbiota fúngica em que a população se encontra submetida. Para monitorar a ocorrência de doenças alérgicas causadas por fungos inalados, faz-se necessário conhecer a quantidade e qualidade de amostras isoladas, a frequência que ocorre determinado fungo e o total de exposições do indivíduo ao ambiente. (MEZZARI *et al*., 2003).

Durante o período pandêmico causado pelo vírus SARS-CoV-2, estimulando, em alguns organismos, o desenvolvimento da COVID-19; houve um aumento crítico de internações e tratamentos que prejudicam a resposta imunológica dos pacientes. Dessa forma, foi também esperado, um aumento de coinfecções por microrganismos, dentre eles os fungos. A relevância está na possibilidade do agravamento dos sintomas, dificuldade de cura, piora do prognóstico e no aumento das taxas de mortalidade. (NEUFELD, 2020).

Em relação ao custeio do tratamento das micoses sistêmicas, ela poderá ser dispendiosa, podendo ultrapassar o valor de 115 mil dólares por paciente, caso seja utilizado o fármaco Anfotericina B em complexo lipídico, a droga mais cara e eficiente em infecções invasivas. Além disso, um fator comprometedor tanto para saúde humana, quanto para os gastos em tratamentos, é a resistência das drogas atuais tanto em plantações, animais e humanos, devido ao tratamento profilático longo ou empírico utilizando a mesma droga, a carência em diversidade química e na insistência dos mesmos fungicidas em tratamentos repetidos. (MOROSINI, 2019).

2 I MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de coleta

As amostras foram coletadas em ambientes internos referentes a três clínicas e um centro cirúrgico, para análise e controle da qualidade do ar da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

2.2 Coleta dos fungos anemófilos

Foi realizada a primeira coleta durante a estação seca, no dia 24 de Setembro de 2018, onde as placas foram dispostas sobre apoios, a cerca de 50 cm a 1 metro do chão, com espaçamento de aproximadamente 1 a 2 metros entre si e ficaram expostas por 20 minutos em cada ambiente.

Como afirma Zaitz, *et al*. (2017), a técnica de sedimentação em placa de Petri é uma das mais utilizadas, consistindo no depósito de propágulos no meio de cultura, formando colônias após multiplicação e crescimento dos fungos. Embora seja uma técnica qualitativa, fornece informações sobre os fungos mais frequentes, variação sazonal e isolamento dos fungos, podendo serem utilizados no diagnóstico de alergias.

A coleta foi realizada por meio da técnica de sedimentação dos esporos em meio de cultura. As placas de Petri (90mmx20mm) continham os meios de cultura: Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), Ágar-Batata-Dextrose (BDA) e Ágar-Czapek – CZ. A quantidade de placas de Petri utilizadas foi calculada com base nas dimensões de cada ambiente a ser pesquisado, atribuindo às clínicas um e dois, localizadas no térreo e que ocupam o mesmo ambiente, respectivamente 12 e 9 placas; a três, que está localizada no primeiro andar, 21 placas; e a um centro cirúrgico, localizada no térreo e utilizado durante um semestre no ano, 6 placas.

Passado o tempo de exposição das placas de Petri, estas foram fechadas, identificadas e transportadas até o Laboratório de Micologia, do Departamento de Parasitologia da UFAM, onde ficaram incubadas à temperatura ambiente (25°C).

2.3 Observação e contagem das colônias

De acordo com a Resolução-RE Nº 9 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003), para permitir o crescimento, em geral, dos fungos, é necessário um tempo de 3 a 7 dias de incubação a 25 °C. No entanto, fungos da família Dematiácea, necessitam na maioria das vezes de 15 a 30 dias para se desenvolver.

Como observado na Figura 1, procedeu-se o acompanhamento do desenvolvimento das colônias nas placas de coleta e registro da quantidade formada por placas (UFC). Em seguida realizou-se a identificação por numeração e a descrição de todas as características macroscópicas das colônias registradas.

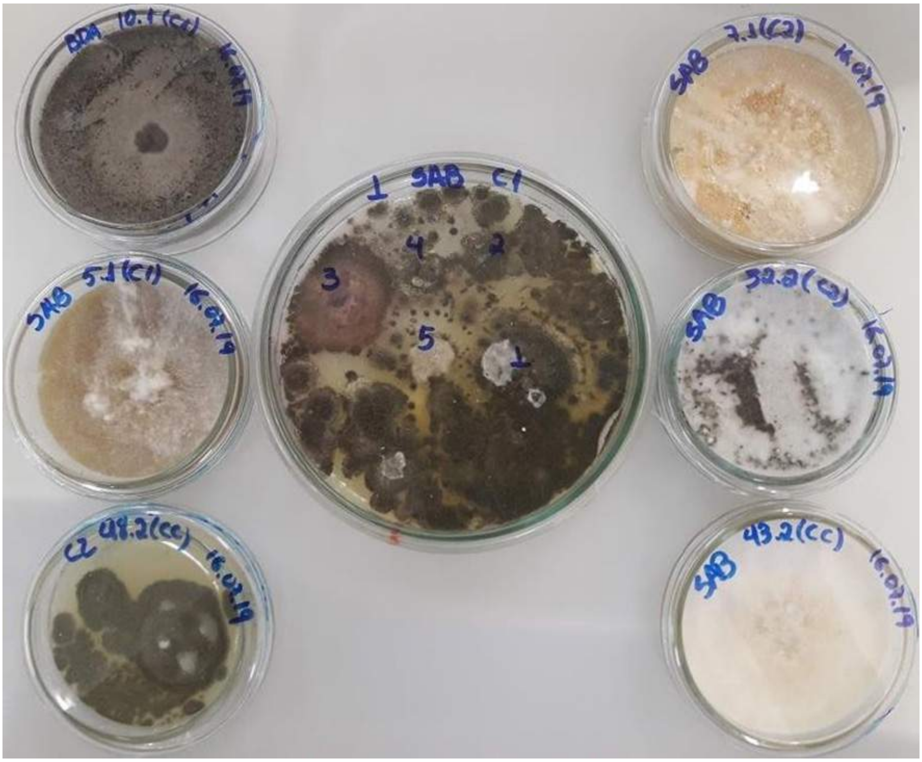


Figura 1- Placa de Petri da coleta ao centro e de isolamento na periferia.

Fonte: Arquivo pessoal.

2.4 Técnica de repique

Após a fase de identificação macroscópica, as colônias foram repicadas, de acordo com a numeração, para tubos de ensaio contendo meios de cultura, para então se obter colônias de fungos isoladas.

2.5 Identificação

No método de identificação, foi realizado o estudo micromorfológico, com visualização direta nas lâminas, preparadas retirando-se pequenas porções da colônia fúngica cultivada em cada tubo de ensaio, sendo estas colocadas na superfície da lâmina contendo o corante Azul de Lactofenol e fragmentadas, para melhor visualização das estruturas dos fungos; sobrepondo em seguida a lamínula, para então observar ao microscópio.

Foi realizado posteriormente a técnica de microcultivo em câmara úmida (Riddel,1950), para confirmação dos gêneros visualizados inicialmente e para possível determinação das espécies, já que esta técnica permite identificar de forma mais segura os

fungos, por meio da visualização da morfologia, tornando possível a identificação a nível de espécie.

2.6 Preservação dos fungos

Os fungos foram preservados através da técnica de água destilada estéril preconizado por Castellani (1939). Na preservação foram utilizadas culturas puras de fungos, cultivadas em placas de Petri até apresentar um bom crescimento (esporulação); em seguida foram cortados, pela margem da colônia jovem, blocos com cerca de 6 a 8 mm; sendo 10 desses blocos transferidos para frascos do tipo penicilina com cerca de 5 ml de água destilada estéril. Os frascos foram fechados e vedados com tampa de borracha e selados, com esmalte incolor, e mantidos à temperatura ambiente.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da visualização inicial em lâmina e da macromorfologia, foi possível identificar o gênero de alguns fungos, tais como: *Cladosporium sp*, *Penicillium sp, Paecilomyce ssp, Aspergillus sp, Fusarium sp* e *Verticillium sp*(em sequência de aparecimento do maior para o menor), como pode ser observado na Tabela 1. Porém, para uma maior e melhor identificação das espécies de fungos e confirmação dos gêneros isolados, foi empregado o método de microcultivo em câmara úmida (Riddel, 1950), permitindo a visualização mais detalhada das estruturas ou da micromorfologia dos fungos.

O método de Ridell ou modificado por Harris, podem ser usados no cultivo dos fungos em lâmina, o que permite durante o exame microscópico, visualizar corretamente a morfologia desses microrganismos. A presença ou não de determinadas estruturas poderá indicar o gênero dos fungos coletados ou em alguns casos também a espécie, ou seja, com base na morfologia verificada microscopicamente, será possível uma melhor identificação dos fungos. (MEZZARI e CAUDURO, 1996).

A tabela 1 apresenta os gêneros de alguns fungos e os respectivos meios de cultura no qual se desenvolveram, frutos da primeira coleta realizada no mês de setembro de 2018, durante a estação seca. O período de crescimento dos fungos observados nesta pesquisa não excedeu o tempo de 15 dias, a despeito de se haver isolado fungos dematiáceos, que necessitam de 15 a 30 dias para o seu completo desenvolvimento. Como pode ser verificado, o fungo mais comumente encontrado foi do gênero *Cladosporium sp*, um fungo dematiáceo, seguido pelo *Penicillium sp*, fungo hialino. Nas demais amostras foi identificado uma espécie do grupo Niger, sendo esta o *Aspergillus niger*.

Os gêneros que foram isolados nos ambientes da Faculdade de Odontologia são frequentemente encontrados durante coletas de fungos anemófilos. Todos possuem potencial de patogenicidade humana.

Os gêneros isolados nesta primeira coleta, como descrito na literatura, são potenciais alergênicos e apresentam riscos de ocasionarem infecções mais graves, dependendo

de alguns fatores relacionados ao ambiente e hospedeiro e, medidas de desinfecção ambiental e assepsia, devem ser tomadas para minimizar a exposição das pessoas a seus propágulos dispersos no ar, pela eliminação da presença destes fungos nos ambientes onde foram realizadas as coletas.

Não foram identificadas, em nível de gênero e espécie específicas, até o presente momento 122 colônias, por conta da ausência de formação de suas estruturas reprodutivas, apresentando estes apenas micélio, o que é denominado de *Mycelia sterilia,* significando micélio estéril. No entanto, preservar-se-á tais amostras para futuro estudo e possibilidade de identificação dos seus gêneros e/ou espécies.

Meios de cultura / **Gêneros**	Sabouraud Dextrose Ágar (SDA)	Ágar-Batata-Dextrose (BDA)	Ágar Czapek (CZ)	**Total**	%
Cladosporium sp	33	7	5	45	22,96
Penicillium sp	20	-	-	20	10,20
Paecilomyces sp	-	4	-	4	2,04
Aspergillus sp	-	1	1	2	1,02
Aspergillus niger	1	-	-	1	0,51
Fusarium sp	-	1	-	1	0,51
Verticillium sp	-	-	1	1	0,51
Mycelia sterilia	46	46	30	122	62,25
Total	100	59	37	**196**	-
%	51,02	30,10	18,88	-	100

Tabela 1- Quantitativo dos gêneros de fungos, por tipo de meio de cultura, encontrados durante a coleta, Set/2018, Manaus, AM.

É possível constatar pela Tabela 1 acima e Figura 2 abaixo, que o maior quantitativo de fungos isolados, com um percentual de 51,02% foi encontrado no Meio SDA, confirmando o fato deste ser um meio Universal, que possui os constituintes essenciais para os fungos que são uma fonte de Carbono (glicose) e uma de Nitrogênio (peptona) e, assim sendo possibilitar o desenvolvimento da grande maioria dos fungos, sendo o CZ e BDA meios seletivos.

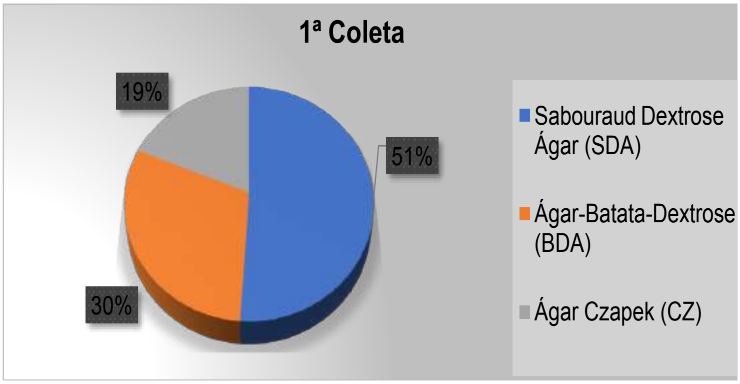


Figura 2- Quantitativo de colônias em relação ao meio de cultura.

Na Tabela 2, é possível verificar a quantidade de gêneros encontrados por clínica e no centro-cirúrgico, a fim de comparar o nível de contaminação entre si. Durante a contagem, verificou-se que 49 colônias (25%) foram encontradas na clínica 1; 73 (37,25%) na clínica 2; 70 (35,71%) na clínica 3; e 4 (2,04%) no centro-cirúrgico, ainda não identificadas completamente denominadas de *Mycelia sterilia*. Também foi observado que em duas placas de Petri não houve crescimento de colônias, mesmo após 3 meses da coleta. Essas placas referem-se ao centro-cirúrgico, indicando um baixo nível de contaminação do local.

Local de Coleta / Gênero	Clínica **1**	Clínica **2**	Clínica **3**	**CC**
Cladosporium sp	16	20	9	-
Penicillium sp	3	11	6	-
Paecilomyces sp	1	2	1	-
Aspergillus sp	1	-	1	-
Aspergillus niger	-	-	1	-
Fusarium sp	1	-	-	-
Verticillium sp	-	-	1	-
Mycelia sterilia	27	40	51	4
Total	49	73	70	4
%	25%	37,25%	35,71%	2,04%

Tabela 2- Quantitativo dos gêneros de fungos encontrados por clínica e no centro-cirúrgico.

CC: Centro-cirúrgico.

O gênero *Cladosporium sp* está associado às feo-hifomicoses cutâneas e sistêmicas ou disseminadas, podendo ocasionar desde oculomicoses, bolor fúngico pulmonar até

lesões cerebrais. (LACAZ *et al.*, 2002).

O gênero *Penicillium sp* é um agente etiológico relacionado a infecções pulmonares, queratites, otomicoses, endoftalmites e infecções do trato urinário. Além disso, a infecção é adquirida pela inalação do fungo, havendo, portanto, um risco de infecção. (MARTINS, MELO e HEINS, 2005).

De acordo com Martins, Melo e Heins (2005), o fungo do gênero *Fusarium sp* é o agente mais comum dentre as hialo-hifomicoses causada por inoculação traumática. Diversas espécies podem causar queratites, endoftalmites, endocardites, fungemia e infecções disseminadas.

O gênero *Paecilomyces sp* é agente de variadas infecções, tais como: oculomicoses, pneumonias, sinusites, endocardites, fungemia e onicomicose, entre outros. Além de ser também a causa de várias infecções em animais. (MARTINS, MELO e HEINS, 2005).

A segunda coleta foi realizada em fevereiro de 2019, durante a estação chuvosa, utilizando os mesmos procedimentos da primeira coleta. De acordo com a Tabela 3, obteve-se menor número de colônias, num total de 126 colônias, sendo os gêneros mais prevalentes o *Aspergillus sp* em um total de 22 colônias (17,4%) sendo 11 da espécie *A. flavus* (8,7%); e o gênero *Penicillium sp* com 5 (3,9%). Além disso, 83 colônias não produziram estrutura reprodutiva, somente micélio e, portanto, não puderam ser identificadas sendo então classificadas como *Mycelia sterilia*.

Os dados indicam que o maior número de colônias se desenvolveu no Ágar-Batata-Dextrose (35,7%), seguido pelo Ágar Czapek (32,5%) e Sabouraud Dextrose Ágar (31,8%), Figura 3.

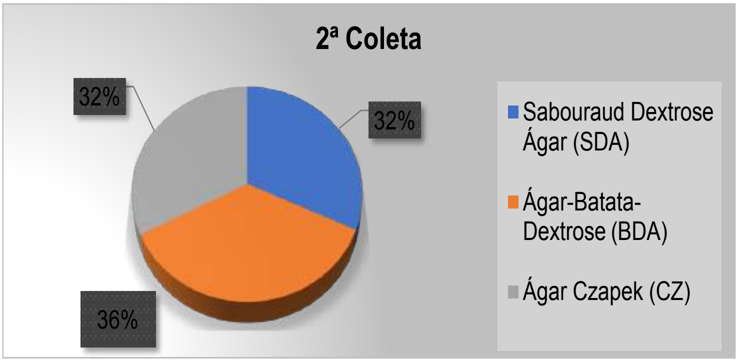


Figura 3- Quantitativo de colônias por meio de cultura.

Meios de cultura / Gêneros	Sabouraud Dextrose Ágar (SDA)	Ágar-Batata-Dextrose (BDA)	Ágar Czapek (CZ)	**Total**	**%**
Aspergillus sp	3	-	-	3	2,4
Aspergillus flavus	-	8	3	11	8,7
Aspergillus niger	1	1	1	3	2,4
Aspergillus glaucus	-	-	3	3	2,4
Aspergillus oryzae	2	-	-	2	1,6
Penicillium sp	5	-	-	5	3,9
Penicillium lilacinum	-	-	1	1	0,8
Penicillium citrinum	-	-	2	2	1,6
Rhizopus sp	-	-	3	3	2,4
Cladosporium sp	-	1	-	1	0,8
Geotrichum sp	1	-	-	1	0,8
Dematiáceos	4	-	3	7	5,5
Levedura	-	1	-	1	0,8
Mycelia sterilia	24	34	25	83	65,9
Total	40	45	41	**126**	-
%	31,8	35,7	32,5	-	100

Tabela 3- Quantitativo dos gêneros de fungos encontrados durante a coleta, Set/2018, Manaus, AM. CC: Centro-cirúrgico.

A Tabela 4, mostra o quantitativo de colônias fúngicas nos ambientes estudados, tendo o maior número na Clínica 3 (49,2%) com 62 colônias: seguido pela Clínica 1 (20,6%) com 26 colônias e Clínica 2 e Centro Cirúrgico com 19 colônias cada (15,1%). Por meio desses dados é possível comparar o nível de contaminação entre os ambientes.

Local de Coleta / Gênero	Clínica **1**	Clínica **2**	Clínica **3**	**CC**
Aspergillus sp	3	-	-	-
Aspergillus flavus	1	-	7	3
Aspergillus nige	1	1	-	1

Aspergillus glaucus	-	-	3	-
Aspergillus oryzae	-	1	1	-
Penicillium sp	4	-	-	1
Penicillium lilacinum	-	-	1	-
Penicillium citrinum	-	-	2	-
Rhizopus sp	-	-	3	-
Cladosporium sp	-	1	-	-
Geotrichum sp	-	-	1	-
Dematiáceos	3	1	1	2
Levedura	-	-	-	1
Mycelia sterilia	14	15	43	11
Total	26	19	62	19
%	20,6%	15,1%	49,2%	15,1%

Tabela 4- Quantitativo dos gêneros dos fungos encontrados por clínica e no centro-cirúrgico.

CC: Centro-cirúrgico.

A redução dos níveis de propágulos do ar da primeira para a segunda coleta, apesar da segunda coleta ter sido realizada durante o período chuvoso,quando deveria ter maior quantidade de colônias pelo aumento da umidade, que cria ambiente mais propício, decorreu da intervenção nos ambientes com pintura e correção de infiltrações; além da limpeza e desinfecção de rotina, ficando este ambiente sem uso até o momento em que ocorreu a segunda coleta, pois o fluxo de pessoas também carreia esporos de um local para outro.

De acordo com a Tabela 5 abaixo, comparando os gêneros comumente encontrados durante a primeira e a segunda coleta, constata-se que os mais prevalentes foram o *Cladosporium sp*, *Penicillium sp*e *Aspergillus flavus.* Na análise individual, nota-se uma diversificação dos gêneros fúngicos em relação as coletas, pois os mais frequentes na primeira coleta foram o *Cladosporium sp* e *Penicillium sp*, enquanto que na segunda coleta foram o *Aspergillus sp* e *Penicillium sp*. Apesar de coincidentes em ambas as coletas, o gênero *Penicillium sp* tem o número de colônias reduzido drasticamente de 20 na primeira coleta para 5 na segunda. Emrelação às espécies, o gênero *Aspergillus flavus* foi o que apresentou maior quantidade de colônias.

Gêneros	Coleta 1	Coleta 2	Total
Cladosporium sp	45	1	46
Penicillium sp	20	5	25
Aspergillus flavus	-	11	11
Aspergillus sp	2	3	5
Aspergillus niger	1	3	4
Paecilomyces sp	4	-	4
Aspergillus glaucus	-	3	3
Rhizopus sp	-	3	3
Aspergillus oryzae	-	2	2
Penicillium citrinum	-	2	2
Penicillium lilacinum	-	1	1
Fusarium sp	1	-	1
Geotrichum sp	-	1	1
Levedura	-	1	1

Tabela5- Prevalência dos gêneros de fungos encontrados nas coletas 1 e 2.

Os resultados obtidos tanto na primeira quanto na segunda coleta, corroboram com os dados presentes na literatura em relação ao quantitativo de fungos normalmente coletados no ar e na sua diversificação, de acordo com os períodos secos e chuvosos. (FONSECA e CONCEIÇÃO,1977; LACAZ *et al* 2002; MEZZARI *et al*, 2003; TRABULSI e ALTERTHUM, 2015).

Alguns dos principais fungos podem ser vistos nas Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.



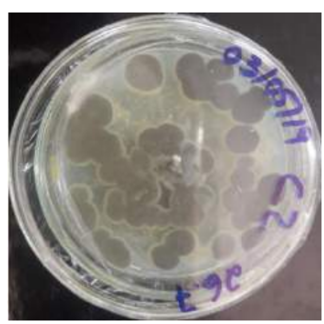
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 4 - *Aspergillus* sp.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5 - *Cladosporium* sp.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6 - *Penicillium* sp.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 7 - *Paecilomyces* sp.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 8 - *Verticillium* sp.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 9 - *Rhizopus* sp.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10 - *Fusarium* sp.

4 | CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir:

• A técnica de isolamento por sedimentação foi eficiente para a definição da frequência de ocorrência dos fungos em ambas as coletas, dadas pela contagem da Unidades Formadora de Colônias (UFC);

• A temperatura e o ambiente de incubação usados, foram adequados para o desenvolvimento dos fungos;

• O uso do método de Riddel para identificação das colônias possibilitou a comprovação de certos gêneros e o reconhecimento de determinadas espécies;

• As colônias encontradas nas coletas 1 e 2 são agentes de infecções humanas, tais como: infecções pulmonares (pneumonia, bolor pulmonar), sinusite, endofitalmite, otomicose, onicomicose, endocardite, infecção cerebral;

• A preservação dos fungos isolados, pela técnica de Castellani, permitirá que os mesmos sejam utilizados em pesquisas futuras;

• A realização das coletas durante os períodos seco e chuvoso na Região Amazônica, apresentaram diferenças tanto na diversidade fúngica quanto no quantitativo de

colônias, sendo menor na segunda coleta;

• Houve menor quantidade de colônias isoladas na segunda coleta decorrente de medidas de limpeza e desinfecção realizadas após a primeira coleta;

• Há relação direta entre a limpeza e desinfecção com a qualidade do ar e quantitativo de propágulos fúngicos dispersos;

• É possível e eficaz, providenciar medidas de limpeza e desinfecção a fim de minimizar a quantidade de propágulos fúngicos dispersos no ar e, consequente exposição aos bioaerossóis e sua ação prejudicial nos seres humanos.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, B.G.K. **Identificação de fungos anemófilos e de superfície com potencial patogênico em ambiente de contato direto e com grande circulação de pessoas**. 2021. TCC-Biomedicina, Centro Universitário de Várzea Grande, Várzea Grande.

BRASIL. ANVISA. Resolução N°9, de 2003. Determina a publicação de Orientação Técnica elaborada por Grupo Técnico Assessor, sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 de Janeiro de 2003. Seção1, p.35.

FONSECA, O.J.M; CONCEIÇÃO, L.A. Fungos anemófilos de Manaus. **Acta Amazonica**, Manaus, vol.7, n.4, p. 497-501 , 1977.

LACAZ, C.S; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9ed. SãoPaulo: Sarvier, 2002.

LIMA, M.L.F.; LIMA, J.S.; SILVA, M.T. Fungos anemófilos: Avaliação da microbiota do ar em ambientes internos e externo. **Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**. Sobral, v. 20, n. 1, p. 88-95, 2019.

MARTINS, J.E.C.; MELO, N.T.; HEINS-VACCARI, E.M. **Atlas de micologia médica**. 1ed. Barueri,SP: Manole, 2005.

MEZZARI, A.; CAUDURO, P. **Micologia no laboratório**. 1ed. Porto Alegre: Sagra: D C Luzzatto, 1996.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; Júnior, S.A.S.; BERND, L.A.G.; GESU, G.D. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista da Associação Médica Brasileira**. Porto Alegre, vol. 49, n.3, p.270-73, 2003.

MORISINI, L. Avanço dos fungos. **Radis**. ed. 196, p. 26-33, 2019.

NEUFELD, P. M. A COVID-19 e o diagnóstico da aspergilose pulmonar invasiva. **RBAC**. Rio de Janeiro, v. 52, n. 2, p. 173-85, 2020.

SILVA, D.P. *et al*. Fungos anemófilos isolados de bibliotecas de instituições de ensino da Região Nordeste do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. Maceió, v. 12, 2021.

SOUSA, K.S.; FORTUNA, J.L. Microrganismos em ambientes climatizados de consultórios odontológicos em uma cidade do extremo sul da Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**. Itanhém (BA), vol.35, n.2, p.250-63,2011.

TRABULSI, L.R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 6.Ed. SãoPaulo:Atheneu, 2015.

CAPÍTULO 12

OCORRÊNCIA DE ORGANISMOS PATOGÊNICOS PRESENTES NA ÁGUA E NAS FEZES DE CANIS LUPUS FAMILIARIS DA REGIÃO DE CURITIBA-PR, BRASIL

Data de aceite: 01/02/2022

Adriele da Costa Trindade
Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Campus Curitiba/PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI

Isabella Santos Delavy
Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas, Campus Curitiba/PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR. PesquisadoraPIBIC/ICETI

Jean Carlos Machado da Costa
Orientador, Mestre, UNICESUMAR, Pesquisadordo Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e Inovação– ICETI

RESUMO: Foram examinadas, pelo laboratório de Análises Clínicas da Universidade Cesumarde Curitiba, 100 amostras fecais de cães de sexo e idade variadas. Destas, 41 eram decães domésticos com acessolimitadoa áreas públicas, 43 eram de cães de rua, e 16eram amostras provenientes de clínicas veterinárias. Como resultado, obteve-se *Toxocarasp*. em 8% (n=8) das amostras, *Trichuris vulpis* em 6% (n=6), *Strongyloides stercoralis* em2% (n=2), *Ascaris lumbricoides* em 1% (n=1) das amostras. Os métodos utilizados para estes diagnósticos foram o método de Faust e o método de Hoffman, Ponse Janer Ainda, foram analisadas 32 amostras de água Os resultados dessas análises constataram a presençade *Klebsiellaoxytoca* em 93,7% (n=30) das amostras, de *Shigella dysenterise* em 3,1% (n=1), de *Klebsiella rhinoscletomatis* em 3,1% (n=1) e de *Enterobacter sakazakii* em 3,1% (n=1) das amostras. Revela-se, diante desses dados, a presença de parasitas com potencial zoonótico e de bactérias enteropatogênicas, evidenciando a necessidade de medidas de controle para a segurança dos animais e dapopulação humana.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias, enteropatogênicas*; Canis lupus familiaris*; cropoparasitologia; Curitiba-PR.

1 I INTRODUÇÃO

Com o passar do anos houve uma crescente no número de animais domésticos nos grandes centros urbanos, o que acarreta em um maior contato humano-animal, conferindo, dessa maneira, um aumento no risco de zoonoses na população humana (TESSEROLLI, 2005). Essa relação tão próxima entre humanos e animais de estimação tornou possível o compartilhamento de mais de 60 espécies parasitárias (MACPHERSON 2005).

Em 2020, na cidade de Curitiba-PR, houveram inúmeros casos envolvendo o protozoário parasita *Giardia lamblia,* causador da giardíase. O aumento exponencial desses casos trouxe uma forte preocupação para os profissionais da saúde animal, pois este parasita impede a absorção de nutrientes causando a síndrome de má absorção dos nutrientes (BECK et al, 2005; LENZI, 2013) levando à fortes diarreias e, se não tratado, até a morte do animal. Neste contexto, este trabalho objetivava apenas esclarecer a frequência atual

das ocorrências de *Giardia spp.* No entanto, ao decorrer da pesquisa, notou-se que não havia nenhum cisto deste parasita em nenhuma das amostras fecais ou de água desses animais, o que nos leva a pensar que o tratamento para a giardíase nos animais infectados foi realizado com sucesso, impedindo uma nova onda de infecção.

Apesar de não se constatar giárdia nestes animais,foram observados outros parasitas também relevantes, além de bactérias patogênicas presentes na água a qual os animais domésticos bebem.

Ascaris lumbricoides, Strongyloides stercolaris, Toxocara sp., Trichuris vulpis, foram os endoparasitas encontrados em algumas das 100 amostras fecais de cachorros de rua, de estimação e de clínicas veterinárias analisadas entre os meses de maio a julho do ano de 2021. Ainda, foram encontradas bactérias patogênicas nas amostras de água, são elas a *Enterobacter sakazakii, Klebsiella oxytoca, Klebsiella rhinoscletomatis* e a *Shigella dysenterise.*

Quando presentes em grandes quantidades o *T. vulpis* causa uma inflamação diftérica da mucosa cecal, ocorre distensão abdominal, diarreia, que pode ou não ser sanguinolenta, sendo assim, ocorre anemia e baixa de hemoglobina (LOGO *et al,* 2012; REMM, 2007), podendo ser fatal quando não tratado. O S. *stercoralis* possui uma grande facilidade de transmissão, caráter de cronicidade, além da auto infestação que gera hiperinfestação e disseminação, e a possibilidade de reagudização em indivíduos imunodeprimidos evoluindo muitas vezes para óbito (MAIA et al., 2006). A transmissão ocorre em torno da heteroinfecção onde, em pouco tempo, as larvas infectantes conseguem atingir a derme, a circulação linfática e sanguínea e em seguida o coração os pulmões e intestino, mas também pode acontecer através da ingestão de água e alimentos contaminados com larvas filarióides (MINÉ, 2009).

Todas as bactérias identificadas presentes nas amostras de águados animaisdomésticos são pertencentes à família Enterobacteriaceae uma das famílias bacterianasmaisimportantesquepossuemumagamaenormedefatoresdevirulência.Suasinfecções podem ser tanto intestinais quanto extraintestinais, podendo ser localizadas ousistêmicas(ALTHERTUM,2015).

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado aos arredores da Universidade Cesumar em Curitiba-PR, percorrendo os bairros Portão e Novo Mundo. Foram coletadas 100 amostras fecais, sendo 41 amostras de cães domésticos, 43 de cães de ruas, e 16 provenientes de clínicas veterinárias. Todas as 32 amostras de água foram coletadas da vasilha dos cães domésticos para verificar a presença de parasitas e de bactérias enteropatogênicas.

Existem diversos métodos para fazer a detecção de protozoários e helmintos nas fezes, sendo que os mais adequados são os métodos de flutuação, além de serem os mais

econômicos. Todas as amostras fecais passaram por dois processos, um deles é a técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco a 33%, conhecido também como Método de Faust. Esta técnica foi desenvolvida justamente para identificar cistos de protozoários, é de fácil execução e o mais indicado para o diagnóstico de *Giardia spp.* Devido ao potencial zoonótico dos parasitas, adequadas precauções devem ser tomadas quando em contato com as fezes ou animais infectados (BECK *et al,* 2005; LENZI, 2013).

O Método de Faust (FAUST *et al,* 1938), ou centrífugo-flutuação, consiste na centrífugo-flutuação em sulfato de zinco das fezes. Em um becker coloca-se 5g da amostra e água destilada, homogeneiza-se com um bastão. Com o auxílio de gazes, filtra- se o que foi homogeneizado em outro becker. Em um tubo para centrífuga coloca-se 10mL da amostra, se for necessário basta inserir água destilada para complementar. Insere-se na centrífuga por um minuto em 2500rpm. Depois, retira-se o tubo da centrífuga, descarta-se o sobrenadante e insere-se 10mL de água destilada novamente. É necessário repetir esta etapa, no mínimo três vezes, até que o sobrenadante esteja límpido. Estando límpido, retira-se o sobrenadante, homogeneíza-se a amostra e insere- se 10mL de sulfato de zinco a 33% e insere-a, pela última vez, na centrífuga por um minuto a 2500rpm. Os cistos e ovos leves estarão presentes na película superficial que pode ser colhida com o auxílio de uma alça de platina. Confecciona-se, então, uma lâmina, tratada opcionalmente com lugol, para observação ao microscópio óptico.

Outro método também utilizado para o exame parasitológico de fezes é o de sedimentação espontânea, também conhecido como método de Hoffman, Pons e Janer (HOFFMAN *et al,* 1934). Para realizar este método é necessária inserir uma porção das fezes em um becker, um pouco da água destilada e mexer com um bastão até homogeneizar todo o conteúdo. Após isso, com o auxílio da peneira e da gaze faz-se a filtração para dentro de um cálice inserindo mais água destilada até que chegue aos 250mL. Após isso, deixa-se por, no mínimo, duas horas em sedimentação. O material sedimentado é posto em uma lâmina para análise em microscopia óptica. Para melhor observação uma gota de lugol é inserida na lâmina.

Para a identificação das bactérias presentes na água que é diretamente consumida pelos animais de moradia domiciliar, foram realizados os métodos de cultura de bactérias, coloração de Gram, teste bioquímico e teste de antibiograma, sendo que este último ainda percorre a fase de análise.

Com as amostras de água coletadas realizou-se esfregaços com cada amostra em placas de petri com o meio de cultura ágar chocolate, constituído por sangue de cavalo, e após isso todas as amostras foram colocadas na estufa por um período de 48h para o crescimento das colônias. Posteriormente, testes bioquímicos foram feitos utilizando os meios Mili e EPM, e o reativo de Kovacs como ativador, para conseguir identificar quais eram as possíveis bactérias presentes nas amostras. Insere-se, com o auxílio de *swab's* uma amostra da cultura nos meios Mili e EPM, e duas gotas do reativo em cada meio.

Após isso, deixa-os na estufa pelo período de 48 horas. Foram feitas análises das amostras, após retiradas da estufa, para avaliar as características que cada uma apresentava. Foram avaliadas a motilidade, a produção de H2S, a fermentação e a presença de bolhas de gás.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 100 amostras averiguadas, ao todo, 17% foram positivas para parasitos identificados (n=17). Das 41 amostras de cães domésticos, 19,5% (n=8) estavam infectadas, das 43 amostras de cães de rua apenas 16,3% (n=7) apresentaram parasitos, e das 16 amostras provenientes das clínicas 12,5% (n=2) positivaram para parasitos. Obteve-se *Toxocara sp.* em 47% das amostras (n=8), *Trichuris vulpis* em 35,3% (n=6), *Strongyloides stercoralis* em 11,7% (n=2), *Ascaris lumbricoides* em 5,88% (n=1). O método que se apresentou mais eficiente foi o método de Faust com 88,2%, o que compreende 15 amostras das 17 parasitadas.

Um dos parasitas do sistema gastrointestinal de grande importância clínica é o S. *stercoralis* pois é descrito como sendo altamente persistente ao parasitar um indivíduo, podendo durar anos no organismo de seu hospedeiro. O indivíduo parasitado apresenta sintomas como, vômito, náuseas, diarreia, surtos disentéricos, anemia hipocrômica, sudorese, emagrecimento, perfuração intestinal e eosinofilia (MAIA *et al.*, 2006). Sendo o parasita intestinal mais frequente no mundo, o A. *lumbricoides* é o causador da enteroparasitose ascaridiose. A transmissão ocorre pela ingestão de água ou alimentos contaminados com os ovos na forma larvária infectante. Os sintomas consistem em febre,tosse, eosinofilia sanguínea elevada, dispnéia, dor torácica, manifestações alérgicas, bronquite e algia abdominal (PATRIARCHA, 2012).

Ainda não houve comprovação, mas se a espécie encontrada de Toxocara sp. for Toxocara canis tem-se uma grande preocupação pois ele é um parasita intestinal que pode causar elevado número de infecções e até a morte do animal (TRILLO- ALTAMIRANO *et al.,* 2003). Além disso, estudos feitos por Carvalho et al (2011) afirmam a infecção de pessoas por T. canis, quando em contato com cães infectados.

Solo e os cursos de água contaminados com ovos de T. vulpis são fontes de infecção. Vômito e fezes com catarro sanguinolento e emagrecimento podem ser observados, e em animais muito jovens pode ocorrer prolapso retal (LOGO *et al,* 2012 & BREMM, 2007).

Com o teste bioquímico pode-se identificar quais eram as bactérias presentes na água. O teste revelou que nenhuma das 32 amostras verificadas apresentou produção de H2S, 3,7% (n=1) apresentou motilidade, 96,8% (n=31) apresentaram-se fermentadoras e destas apenas 3,8% (n=1) formou bolhas de gás. Desse modo, evidenciou-se a presença de coliformes fecais em todas as amostras de água, pois quatro diferentes espécies de enterobactérias foram identificadas, são elas a *E. sakazaki,* a *K. oxytoca,* a *K. rhinoscleto-*

matis, e a *S. dysenterise*, sendo que a *K. oxytoca* estava presente em 93,7% das amostras (n=30).

As *E. sakazaki* são classificadas como bactérias oportunistas, formadoras de uma cápsula de material polissacarídeo. Ao se proliferar no hospedeiro causam bacteremia, septicemia, meningite em neonatos e podem causar também enterocolite necrozante. (ESPER et al, 2010 & CHENU *et al,* 2009). A espécie *K. oxytoca,* também é caracterizada como sendo oportunista. Possui a capacidade de desenvolver as enzimas β-lactamases de espectro estendido carbapenemases que conferem resistência bacteriana aos antibióticos. De acordo com um estudo realizado, essa bactéria pode ser o agente causal de um tipo de dermatite disseminada em cães (AQUINO *et al,* 2018).

Outra espécie encontrada foi a *K. rhinoscleromatis*, uma bactéria encapsulada que acomete o trato respiratório dos indivíduos, afetando também outras regiões como a laringe, a nasofaringe, a traqueia e os brônquios, causando lesões granulosas destrutivas do *renoscleroma.* É de difícil diagnóstico devido aos sintomas não serem específicos (RAYMUNDO et al, 2011). E as *S. desentesiae* são bacilos disentéricos imóveis, fermentadoras de glicose onde normalmente não ocorre a produção de gás. É uma bactéria não fermentadora de manito e nem de lactose, e também não é produtora de H2S. Produz uma exotoxina protética de ação neuroenterotrópica e se prolifera no interior das células onde consegue produzir uma citotoxina que gera a inibição da síntese de proteínas, e um distúrbio de equilíbrio hidrossalino, o que gera a fase diarréica na infecção (BIER, 1984).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se a prevalência de parasitos em amostras de cães domésticos, o que eleva o risco da transmissão de zoonoses. Além disso, o maior percentual parasitológico apresentado foi de *Toxocara sp.* e, em seguida, *Trichuris vulpis.*

Ainda, 30 das 32 amostras de água analisadas estavam contaminadas com *Klebsiella oxytoca.* Esta bactéria possui grande resistência à antibióticos, o que prejudica o tratamento caso o animal seja infectado.

Torna-se, portanto, necessário tomar algumas medidas profiláticas como assegurar aos cães domésticos, principalmente, as vacinas e vermífugos necessários durante toda a vida, assim como o acompanhamento veterinário necessário. Ainda, enfatiza-se a importância de se higienizar corretamente os recipientes nos quais eles se alimentam e o local no qual eles dormem, afim de diminuir o risco de transmissão de organismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

ALTHERTUM, Flavio. **Microbiologia.** 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015. p. 25-912.

AQUINO, Simone; HERZIG, Karin. **Klebsiella oxytoca multirresistente como agente de dermatite disseminada em cão.** Acta Scientiae Veterinariae, v. 46, n. 1, p. 324, 2018. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/46-suple-1/CR_324.pdf>. Acesso em: 14 Jul. 2021.

BARTMANN, Adriane; ARAUJO, Flávio Antônio Pacheco de. **Frequência de *Giardia lamblia* em cães atendidos em clínicas veterinárias de Porto Alegre, RS,** Brasil. 2004. Cienc. Rural, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1093-1096. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782004000400020&lng= en&nrm=iso>. Acessado em: 24 Mar. 2021.

BECK, C. A., Araujo, A. P., Olicheski, A. T. & Breyer, A. S. **Frequência da infecção por *Giardia lamblia* avaliada pelo método de Faust e Cols (1939) e pela coloração da Auramina, no município de Canoas, RS, Brasil.** 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v35n1/a20v35n1.pdf>. Acessado em: 24 Mar. 2021.

BIER, Otto. **Microbiologia e Imunologia.** 23. Ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. p.**- 1234.

BREMM, Mariana. **Infecção parasitária por nematódeos em cães do canil municipal de Santa Cruz do Sul/RS.** 2007. Disponível em:<https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp- content/uploads/2013/05/mariana.pdf>. Acesso em:23 Jul. 2021.

CABRAL, Adriane Borges. **Caracterização genética de isolados clínicos de Enterobacter aerogenes e Enterobacter cloacae: determinantes de resistência e virulência.** 2016. Disponível em: <https://attena.ufpe.br/bitstream/123456789/17748/1/TESE_11_04_16_digital_Adriane%2 0Borges.pdf>. Acesso em: 14 Jul. 2021.

CARVALHO, Elaine A. A.; ROCHA, Regina L. **Toxocaríase: larva migrans visceral em crianças e adolescentes.** Jornal de Pediatria [online]. 2011, v. 87, n. 2., pp. 100-110. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0021-75572011000200004>. Acesso em: 23 Jul. 2021.

CHENU, J. W.; COX, J. M. **Cronobacter (‘Enterobacter sakazakii’): current status and future prospects.** Letters in applied microbiology, v. 49, n. 2, p. 153-159, 2009. Disponível em:< https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472- 765X.2009.02651.x>. Acesso em: 14 Jul. 2021.

ESPER, Luciana M. R., *et al.* **Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) e Bacillus cereus= quorum sensing, formação de biofilme e ação de sanitizantes.** 2010. Disponível em:< http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/255743/1/Esper_LucianaMariaRamires_ D.pdf>. Acesso em: 14 Jul. 2021.

FAUST EC, D’ Antoni JS, Odon V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, *et al.* **A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces: I. Preliminary communication.** Am J Trop Med 1938; 18(2): 169-183.

FERREIRA, Juliana Isabel Giuli da Silva *et al.* **Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in São Paulo, SP, Brazil.** 2016. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 435-440. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016000400435&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 24 Mar. 2021.

FUNADA, M.R. *et al.* **Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo.** 2007. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1338-1340. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102- 09352007000500038&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 24 Mar. 2021.

HOFFMAN WA, Pons JA, Janer JL. **The sedimentation-concentration method in Schistosomiasis Mansoni.** PR J Public Health Trop Med 1934; 9: 288-291.

LENZI, N. R. R. **Atualidades em giardíase na medicina veterinária: Revisão de literatura.** 2013. Trabalho de Graduação, Fundação Educacional Jayme de Altavila, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Disponível em: <https://consultadogvet.files.wordpress.com/2017/03/monografia20giardiase.pdf>. Acessado em: 24 Mar. 2021.

LONGO, Celso E.M., *et al.* **Trichuris vulpis.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v. 11, 2008. Disponível em:<http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/XyKkjv9YmlwQfqm_20 13-6-13-15-14-48.pdf>. Acesso em: 23 Jul. 2021.

MACPHERSON, Calum NL. **Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. International Journal of Parasitology.** 2005; 35(11-12):1319-1331. doi:10.1016/j.ijpara.2005.06.004.

MAIA, Tânia Maria Cavalcante *et al.* **Hiperinfestação por Strongyloides stercoralis.** Revista Brasileira em Promoção da Saúde, v. 19, n. 2, p. 118-122, 2006. Disponível em:<file:///C:/Users/Hedilvane/Downloads/970-6488-1-PB%20(1).pdf>. Acesso em: 22 Jul. de 2021

MINÉ, Julio Cesar. **Caracterização de cepas de Strongyloides stercoralis (Bavay, 1876) Stiles & Hassal, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de pacientes com e sem sintomatologia da região de Araraquara-SP. 2009.** Disponível em:<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/104538/mine_jc_dr_arafcf.pdf?se quence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 Jul. de 2021.

MUNDIM, M.J.S. *et al.* **Frequência de Giardia spp. por duas técnicas de diagnóstico em fezes de cães.** 2003. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 55, n. 6, p. 770- 773. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352003000600016&lng=en&nrm=iso>. Acessado em: 24 Mar. 2021.

PATRIARCHA, Amanda P. **Parasitismo por Ascaris lumbricoides: abordagem teórica.** 2012. Disponível em:<http://repositorio.faema.edu.br/bitstream/123456789/274/1/PATRIARCHA%2C%20A.%20P.%20-%20PARASITISMO%20POR%20Ascaris%20lumbricoides%20ABORDAGEM%20TE%C3%93RICA.pdf>. Acesso em: 22 Jul. de 2021.

RAYMUNDO, Igor Teixeira *et al.* **Rhinoscleroma.** Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia, v. 15, n. 4, p. 526-528, 2011. Disponível em:< https://www.scielo.br/j/aio/a/4p49PXwk8s6kYDRD34CDxdL/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 14 Jul. de 2021.

SANTOS, Daniella Fabíola dos. **Características microbiológicas de Klebsiella pneumoniae isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial.** Goiânia (GO): Universidade Católica de Goiás, 2007.

TESSEROLLI, Gisele L.; FAYZANO, Luciana; BACILA AGOTTANI, Jorge Victor. **Ocorrência de parasitas gastrintestinais em fezes de cães e gatos, Curitiba-PR.** Revista acadêmica Ciência Animal, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 31-34, out. 2005. ISSN 2596-2868. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9207/8859>. Acesso em: 15 jul. 2021.

TRILLO-ALTAMIRANO, MARÍA DEL PILAR; CARRASCO, ADELA JANNET; CABRERA, RUFINO. **Prevalencia de helmintos enteroparásitos zoonóticos y factores asociados en Canis familiaris en una zona urbana de la ciudad de Ica, Perú.** Parasitol. latinoam., Santiago , v. 58, n. 3-4, p. 136-141, jul. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122003000300009&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 20 Jul. 2021.

WANG G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. **The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumoniae.** Int J Environ Res Public Health.

CAPÍTULO 13

PRINCIPAIS ENTEROPARASITOSES EM CRIANÇAS DE IDADE ESCOLAR NO BRASIL

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 15/12/2021

João Augusto Müller Pereira
Faculdade Anhanguera de Pelotas, Departamento de Biomedicina
Pelotas-RS
http://lattes.cnpq.br/0492340084685128

Karina Rodrigues Irigoyen
Faculdade Anhanguera de Pelotas, Departamento de Biomedicina
Pelotas-RS

Rafaely Piccioni Rosado
Faculdade Anhanguera de Pelotas, Departamento de Biomedicina
Pelotas-RS

Laura Silva de Vasconcellos
Faculdade Anhanguera de Pelotas, Departamento de Biomedicina
Pelotas-RS

Anna Müller Pereira
Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Epidemiologia
Pelotas-RS
http://lattes.cnpq.br/1313890583033254

Débora Liliane Walcher
Faculdade Anhanguera de Pelotas, Departamento de Biomedicina
Pelotas-RS
http://lattes.cnpq.br/7591606331138618

Letícia Fiss
Faculdade Anhanguera de Pelotas, Departamento de Biomedicina
Pelotas-RS
http://lattes.cnpq.br/1761574658881034

RESUMO: As enteroparasitoses são parte de graves problemas de saúde pública – principalmente em países em desenvolvimento – e geralmente estão ligadas às más condições sanitárias, higiênicas e questões socioeconômicas. O objetivo deste estudo foi identificar as principais enteroparasitoses que acometem crianças em idade escolar no Brasil. A metodologia utilizada foi a de revisão bibliográfica, caracterizada como uma pesquisa qualitativa e descritiva, envolvendo temas como enteroparasitoses, enteroparasitose infantil, enteroparasitoses em crianças, parasitos intestinais e parasitose intestinal. Os resultados encontrados na literatura indicam que as duas enteroparasitoses mais comuns em escolares são do helminto *Ascaris lumbricoides* e do protozoário *Giardia lamblia.* Assim sendo, é necessário que haja maior envolvimento de políticas públicas na atenção ao saneamento básico e uma promoção à saúde, através de campanhas sobre conhecimento e importância das enteroparasitoses assim como, métodos de profilaxia e prevenção.

PALAVRAS-CHAVE: Enteroparasitoses. Crianças. Brasil. Helmintos. Protozoários.

MAIN ENTEROPARASITOSIS IN SCHOOL-AGE CHILDREN IN BRAZIL

ABSTRACT: Enteroparasitosis are part of serious public health problems - especially in developing countries - and are usually linked to poor sanitation, hygiene, and socioeconomic issues. The aim of this study was to identify the main intestinal parasites that affect school-age children in Brazil. The methodology used was a literature review, characterized as a qualitative and descriptive research, involving topics such as enteroparasitosis, childhood enteroparasitosis, enteroparasitosis in children, intestinal parasites, and intestinal parasitosis. The results found in the literature indicate that the two most common enteroparasitosis in schoolchildren are the helminth *Ascaris lumbricoides* and the protozoan *Giardia lamblia*. Therefore, it is necessary to have a greater involvement of public policies in the attention to basic sanitation and health promotion, through campaigns about knowledge and importance of intestinal parasites, as well as prophylaxis and prevention methods.
KEYWORDS: Enteroparositosis. Children. Brazil. Helminths. Protozoans.

INTRODUÇÃO

As enteroparasitoses são parte de graves problemas de saúde pública – principalmente em países em desenvolvimento – e geralmente estão ligadas às más condições sanitárias, higiênicas e questões socioeconômicas (RODRIGUES; CARNEIRO; ATHAYDE, 2013).

As crianças representam o grupo mais suscepetível devido a maior exposição com água e solo contaminado, habitos de higiene inadequados (geofagia e onicofagia), além da imaturidade do sistema imunológico nos primeiros dois anos de vida (BASSO et al., 2008). As enteroparasitoses são responsáveis por quadros de diarreia intensa, desnutrição e déficit no desenvolvimento físico e cognitivo (LEIVAS; GONÇALVES; SOUZA, 2015; MENDONÇA; SEROA DA MOTTA 2009; ARAÚJO et al., 2009).

Diante do exposto, torna-se relevante o levantamento das principais enteroparasitoses intestinais em crianças em idade escolar.

METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica, nas bases de busca: SciELO, Lilacs e PubMed. As palavras chaves utilizadas foram: “enteroparasitoses”, “enteroparasitose infantil”, “enteroparasitoses em crianças”, “parasitos intestinais” e “parasitose intestinal”. Ao final foram selecionadas 13 obras sobre parasitoses intestinais para a composição do trabalho e, dentre estas, utilizadas 3 para discussão de dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um estudo realizado por BIOLCHINI (2005), apresenta a prevalência de enteroparasitoses em escolares de 7 a 14 anos de uma área rural de Uberlândia, Minas Gerais. Neste estudo, cerca de 19,7% das crianças que particparam do estudo, estavam

infectadas, sendo que destas, 10,3% estavam infectadas por *Ascaris lumbricoides,* seguido por *Trichuris trichiura* (4,7%), ancilostomídeos (2,9%), *Enterobius vermiculares* (1,2%), *Hymenolepis nana* (0,4%) e *Taenia sp*. (0,2%). Neste mesmo estudo, foi citado que o único protozoário encontrado entre os enteroparasitos foi a *Giardia lamblia* (12,6%).

ARAUJO et al. (2011), em um estudo realizado com crianças estudantes de uma escola particular e outras crianças com idade escolar moradoras de uma favela na cidade de Osasco – SP, observaram que das 34 crianças estudantes da escola particular, apenas duas estavam infectadas, ambas com o parasito *G. lamblia.* Enquanto que das 84 crianças moradoras da favela, 51 foram diagnosticadas com algum tipo de parasito, sendo os mais encontrados: *G. lamblia*, *A. lumbricoides*, *Entamoeba histolytica/dispar*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Cyclospora cayetanensis*, *Blastocystis hominis* e *Cryptosporidium parvum*.

BASSO et al. (2008) realizaram uma análise das parasitoses intestinais em escolares de Caxias do Sul – RS, durante 35 anos. Neste tempo foram realizados 9.787 exames parasitológicos, sendo 5.655 (58%) positivos. A infecção por helmintos foi detectada em 65,1% dos resultados positivos, enquanto 34,9% referiram-se à infecção por protozoários. Os parasitos mais prevalentes foram *A. lumbricoides* (47%); *T. trichiura* (36%); e *E. vermicularis* (8%). Entre os protozoários, destacaram-se: *G. lamblia* (24%) e *E. coli* (20%). Todos os demais parasitos (*Strongyloides stercoralis,* Ancilostomídeos*, Hymenolepis nana, Taenia sp, E. histolytica/E. dispar, Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii,* foram observados com freqüências inferiores a 6%.

Os autores dos estudos citados, relatam qeu as principais consequências das enteroparasitoses em crianças são: diarreia crônica, má absorção, anemia ferropriva, baixa capacidade de concentração e dificuldades no aprendizado (LIMA, 2012 apud KUNZ et al., 2008). Ainda, segundo MENEZES (2008) e NEVES et al. (2005), o baixo crescimento pondero estatural também é uma complicação, sendo atribuído principalmente às altas cargas parasitárias, bem como às constantes reinfecções.

Analisando os dados obtidos através da revisão, podemos observar que as duas enteroparasitoses mais comuns em escolares são do helminto *A. lumbricoides,* o qual pode levar o indivíduo a quadros de obstrução intestinal, além de problemas extraintestinais como asma, e sindrome de Loss e do protozoário *G. lamblia,* que pode causar um atapetamento da mucosa intestinal, impedindo a absorção de nutrientes, causar diarreia, perda de peso, e processo anemico.

CONCLUSÕES

Baseando-se nas informações obtidas através do estudo, pode-se concluir que a prevalência de enteroparasitoses em crianças em idade escolar é inversamente proporcional à condição socio-econômica, ou seja, em crianças da periferia os números de infecções são muito maiores. Em sua maioria estas enteroparasitoses são causadas por

A. lumbricoides e *G. lamblia*, parasitas que apresentam modo de infecção semelhantes, através de solo, água e alimentos contaminados.

Para que a prevalência de enteroparasitoses em crianças seja reduzida, é necessário que haja maior envolvimento de políticas públicas na atenção ao saneamento básico, visto que cenas como crianças brincando descalças próximas a esgoto a céu aberto é recorrente em localidades de situação periférica. Esta realidade é um risco para todos moradores, mas principalmente para aquelas crianças onde ainda não se vê conscientização sobre higienização de mãos antes de realizar alguma refeição ou que, muitas vezes, não possuem água encanada, tornando-se, assim, mais suscetíveis a infecções por diversos parasitos. Além disso, deve-se promover mais campanhas sobre conhecimento e importância das enteroparasitoses no cenário de saúde pública, assim como, métodos de profilaxia e prevenção.

REFERÊNCIAS

ARAUJO FILHO, HUMBERTO B. et al . Parasitoses intestinais se associam a menores índices de peso e estatura em escolares de baixo estrato socioeconômico. **Rev. paul. pediatr**., São Paulo, v. 29, n.4, p.521-528, Dezembro 2011.

ARAÚJO, A. F. V.; LIMA, J. C. M.; PAIXÃO, A. N.; PICANÇO, A. P. **Avaliação da Eficiência dos Serviços de Saneamento Básico no Combate às Endemias nos Municípios do Estado do Tocantins**. In: VII Encontro Nacional da Associação Brasileira de Estudos Regionais e Urbanos, São Paulo, 2009.

BASSO, Rita Maria Callegari et al . Evolution of the prevalence of intestinal parasitosis among schoolchildren in Caxias do Sul, RS. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.41, n.3, p.263-268, Junho 2008.

BIOLCHINI, Carla de Lamare. Enteroparasitoses na infância e na adolescência. **Adolesc Saude**. 2005;2(1):29-32

DE CARLI, Geraldo Attilio. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas**. São Paulo. Editora Atheneu, 2001.

DIAS, G. P. F. **Ações para reduzir a prevalência de enteroparasitoses na área de abrangência da ESF Felicidade do município de Japonvar – MG**. 2014. Monografia (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal de Minas Gerais.

KUNZ, J. M. O. et al. Parasitas intestinais em crianças de escola municipal de Florianópolis, SC – Educação ambiental e em saúde. **Rev. Biotemas**, vol. 21, n.4, ps. 157-162, 2008.

LEIVAS, P. H. S., S. A. M. A., GONÇALVES, R. R., SOUZA, O. T.; **Sustentabilidade, saneamento e saúde infantil no Brasil: uma análise a partir de macro e microdados**. XVIII Encontro de Economia da Região Sul – ANPEC/SUL 2015, Porto Alegre, 2015.

LIMA, W. A.; SANTOS, M. P.; SOUZA L. A. P. Anemia Associada Às Parasitoses Intestinais. **Rev. Conexão Eletrônica**, vol. 9, n.1/2. Três Lagoas - MS, 2012.

MANFROI A, STEIN AT, CASTRO FILHO ED – Sociedade Brasileira de Medicina de Família e Comunidade. **Projeto Diretrizes Abordagem das Parasitoses Intestinais mais Prevalentes na Infância.** Novembro de 2009. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/8_volume/01-abordagem.pdf 1– acessado em 10/11/2018.

MENDONÇA, M. J. C.; SEROA DA MOTTA, R. Saúde e saneamento no Brasil. **Planejamento e Políticas Públicas**, v. 30, 2009.

MENEZES, A. et al. Prevalência de parasitas intestinais em crianças de creches públicas na cidade de Belo Horizonte, Minais Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, vol. 50, ps. 57-59. Minas Gerais. 2008.

MORAES, Ruy Gomes de et al. Parasitologia e micologia humana. Rio de Janeiro. **Cultura Médica**, p. 290-300p, 2008.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana.** 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005. Disponível em: http://szb.org.br/blog/conteudos/bibliografias/06- veterinaria/parasitologia-humna.pdf Acesso em: 10/11/2018

RODRIGUES, Jailson Alberto; CARNEIRO, Wendell Soares; ATHAYDE, Ana Célia Rodrigues. Infecções por helmintos gastrointestinais: perfil de crianças em escolas públicas e privadas do Sertão Paraibano. **News Lab**, v. 186, p. 128-36, 2013.

CAPÍTULO 14

MODELOS EXPERIMENTAIS DE CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 20/12/2021

Airton Vicente Pereira
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Ciências Farmacêuticas
Ponta Grossa – PR
http://lattes.cnpq.br/0503072952509155

Gisele de Oliveira Krubniki Possa
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas
Ponta Grossa - PR
http://lattes.cnpq.br/9890219188831148

Rayza Assis de Andrade
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas
Ponta Grossa - PR
http://lattes.cnpq.br/9420886434626893

Solange Chopek
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas
Ponta Grossa - PR
http://lattes.cnpq.br/6786922331107515

Wesley Rogerio Negri
Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Londrina - PR
http://lattes.cnpq.br/5775681820325232

RESUMO: A cicatrização de feridas é um processo complexo e dinâmico que consiste em uma sequência de três fases - inflamação, proliferação e remodelação. O efeito de novos compostos sobre a regeneração e reparo de tecidos pode ser avaliado por vários modelos. Este capítulo aborda os métodos *in vitro* e *in vivo* usados para estudar a cicatrização de feridas. Apresentamos uma visão geral dos ensaios *in vitro* de cultura de células em monocamada bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D). Os modelos *in vivo* com uso de animais para o estudo de cicatrização de feridas empregam principalmente lesões induzidas na pele de camundongos e ratos e os métodos histoquímicos usados para avaliar o tecido da ferida são descritos. Diversas plantas medicinais contêm compostos que auxiliam na cicatrização de feridas e o presente capítulo finaliza com exemplos de avaliação do efeito cicatrizante de plantas que fazem parte da fitoterapia tradicional brasileira.

PALAVRAS - CHAVE: feridas, cultura de células, fibroblastos, ensaio animal, plantas medicinais.

WOUND HEALING EXPERIMENTAL MODELS: *IN VITRO* E *IN VIVO* STUDIES

ABSTRACT: Wound healing is a complex and dynamic process that consists of a sequence of three phases including inflammation, proliferation, and remodeling. The effect on regeneration and tissue repair of new drugs can be evaluated by various models. This chapter reviews several in vitro and in vivo methods used to study wound healing. We give a general overview of 2-dimensional (2D) cell monolayer and 3-dimensional (3D) culture assays. In vivo

models are also used for study wound healing with mouse and rats being the most frequently employed. Histochemical methods used to evaluate wound tissue are described. Medicinal plants are a rich source of active compounds, which can promote wound healing. At the final of this chapter, examples of traditional Brazilian herbal medicine.are described to illustrate the issues discussed.
KEYWORDS: wounds, cell culture, fibroblasts, animal assay, medicinal plants.

1 I INTRODUÇÃO

A pele é o órgão que reveste o corpo humano e que desempenha várias funções críticas para a sobrevivência do organismo com seu meio. Entre essas funções está a capacidade defensiva do tecido, regulação da temperatura do corpo, e a resposta a traumas ou danos (XU et al, 2015). Quando há de fato dano no tegumento da pele, o órgão conta com diversos mecanismos para conter, reparar, e em algumas vezes reverter o prejuízo estrutural e funcional.

O processo de reparo pode ser dividido em quatro fases que se sobrepõem entre si: coagulação, inflamação, proliferação e remodelamento (EMING et al, 2014). Na fase de coagulação ocorre a oclusão da ferida por meio de coágulos, essa oclusão impede a entrada de organismos estranhos através da lesão, bem como fornece matriz provisória que serve de suporte para a infiltração de células leucocitárias. Na fase da inflamação há o recrutamento de células do sistema imune, liberação de substâncias antimicrobianas, e ativação dos queratinócitos e fibroblastos. A fase de proliferação é marcada pela resolução da inflamação, a síntese de colágeno, angiogênese de vasos linfáticos e capilares. Por fim, a fase de remodelamento se caracteriza pela reorganização da MEC, degradação dos fibroblastos por apoptose, contração da ferida pelos miofibroblastos e em casos de lesões mais superficiais, repigmentação (SHEDOEVA et al, 2019).

Há diversos modelos experimentais para avaliar o efeito cicatrizante de compostos sintéticos, extratos de plantas medicinais e curativos. Entre tais ensaios, destacam-se os modelos *in silico, in vitro, in vivo*. Neste último, utiliza-se animais ou o estudo clínico com pacientes voluntários. Cada modelo oferece vantagens e desvantagens de acordo com o delineamento experimental (WILHELM et al, 2017).

Os testes *in vitro* geralmente são usados para analisar o efeito de alguns componentes sintéticos ou naturais em culturas de células, geralmente fibroblastos e queratinócitos cultivados em meio apropriado. Com o cultivo de células é comum a avaliação da viabilidade celular em que se determina a quantidade de células viáveis após a exposição ao composto em estudo. Ainda, são conduzidos os testes de proliferação que visam a mensuração da taxa da divisão celular resultante da adição do composto ao meio de cultivo (WILHELM et al, 2017).

Os testes de cicatrização *in vitro* mais comuns são os ensaios de migração celular denominados *wound healing* (WH) *assays* (KRAMER et al, 2013) que são classificados em

2D ou 3D.

No ensaio 2D, o cultivo é realizado em monocamada de células. Esse modelo geralmente consiste em causar uma injúria na monocamada celular e em seguida observar e registrar os eventos que acontecem durante a migração das células adjacentes, que visam a oclusão do dano causado. Já os ensaios 3D utilizam um ambiente tridimensional de pele artificial e permitem analisar outras variáveis presentes na cicatrização que seriam impossíveis no modelo 2D, como a presença da matriz extracelular (STAMM et al, 2016).

Os estudos *in vitro* apresentam algumas vantagens. Entre elas podemos citar o baixo custo, a ausência de considerações e protocolos de ética de experimentos em animais, ambientes geralmente controlados com mínima interferência de variáveis e uma maior homogeneidade experimental (GOTTRUP et al, 2000). Evidentemente, os estudos *in vitro* também apresentam desvantagens como, por exemplo, a dificuldade de se extrapolar os resultados para o modelo *in vivo*. Por vezes, os resultados observados no modelo *in vitro* não se reproduzem nos modelos *in vivo* (ROTHEN-RUTISHAUSER et al, 2008).

Os modelos *in vivo* de estudo da cicatrização de feridas, em sua grande maioria, realiza a indução de uma lesão na pele de animais de laboratório. A vantagem do modelo *in vivo* é que a lesão induzida é semelhante à uma situação real, isso para o caso de feridas na pele. Entretanto, o uso de animais, além de envolver aspectos éticos, pode exigir a indução de diabetes para simular uma situação de ferida crônica (PARNELL & VOLK,2019). As medidas da área da lesão e ensaios histológicos e histoquímicos são empregadas para avaliar o fechamento da ferida e a evolução da cicatrização, respectivamente.

Neste capítulo, apresentamos a descrição das principais metodologias de estudos de cicatrização *in vitro* e *in vivo* empregadas em publicações recentes, com destaque para a avaliação do efeito cicatrizante de plantas medicinais.

2 | ENSAIOS *IN VITRO*

2.1 Ensaios 2D

Nos ensaios de cicatrização 2D geralmente se utiliza o método *Scratch assay*, no qual uma lesão é simulada na confluência das células, normalmente com o uso de uma ponteira, com objetivo de criar uma fenda e, posteriormente, analisar a migração celular que ocorre no sentido de preencher o espaço criado na região da ranhura. Entretanto, há outras metodologias para análise de proliferação e migração celular, como por exemplo, danos mecânicos provocados por pressão, danos térmicos e elétricos (STAMM et al, 2016). A tabela 1 mostra algumas das metodologias de ensaios 2D de migração celular.

Ensaio	Avaliação	Vantagens	Desvantagens
Scratch assay	Migração celular	Simples de reproduzir; Baixo custo; Condições experimentais podem ser ajustadas para melhor se adequar ao delineamento de estudo; Quantificação simples; (GRADA et al, 2017)	Não mimetiza fidedignamente a ferida *in vivo* (GRADA et al ,2017); A ferida feita manualmente muitas vezes deixa resíduos e assimetrias no confluente (DE LESO et al, 2018)
Razor Scrape assay	Migração celular	Simples execução; Áreas e forma da lesão são uniformes; Mensuração pode ser feita mais facilmente (LARA-REYES et al 2020)	Variações na confluência de células; Dano na matriz extracelular (LARA_ REYES et al, 2020)
Transwell Assay	Migração; Invasão; Migração transendotelial	Simples execução; baixo custo; Alta flexibilidade (KATT et al, 2016)	Baixa relevância fisiológica; Ensaios para migração e invasão podem se conflitar (KATT et al, 2016)
ECIS	Migração; Proliferação; Viabilidade; Citotoxicidade	Monitoramento do comportamento celular em tempo real; não invasivo (CUI et al, 2017);	O eletrodo padrão suporta somente proporções pequenas de células (GU et al, 2018)

Tabela 1: Ensaios 2D empregados em testes de cicatrização *in vitro*.

2.1.1 Scratch assays

Os ensaios denominados *Scratch assays* são ferramentas importantes para a análise da capacidade migratória celular. Esses ensaios são feitos com a criação de uma fenda no centro da monocamada, criando, desta forma, duas frentes de células separadas pelo espaço criado e, eventualmente, as células irão migrar por ambos os lados e preencher a fenda. Alternativamente, no *Razor Scrape assay* pode ser feito uma grande destruição na monocamada a fim de criar apenas uma frente de células, a migração então se dá em uma única direção (JOHNSTON et al, 2016).

A metodologia *Scratch assay* é amplamente utilizada por oferecer uma série de vantagens, entre elas podemos citar a simplicidade na reprodução, baixo custo, flexibilidade para se adequar a qualquer delineamento experimental e análise simples (GRADA et al, 2017). Quanto às desvantagens, uma vez que é um teste feito em culturas de células, alguns componentes do processo cicatricial *in vivo* ficam ausentes. Entretanto, para estudos *in vitro* que analisam a dinâmica celular durante a cicatrização, o teste *Scratch assay* é o mais indicado. A figura 1 apresenta uma ilustração do *Scratch assay* clássico.

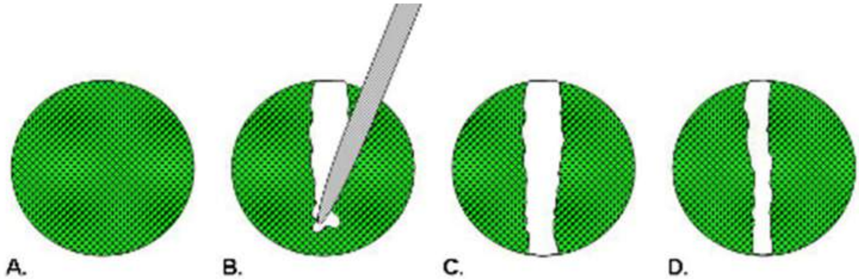


Figura 1: Técnica do *Scratch Assay.* A: Monocamada confluente de células cultivadas (ex. fibroblastos). B: Produção da fenda utilizando objeto pontiagudo. C: Espaço na monocamada mimetizando a ferida. D: Começo da migração dos fibroblastos para selar a fenda. FONTE: HULKOWER & HERBER, 2011.

Como uma variação do *Scratch assay*, o *Razor scrape assay* consiste em pressionar uma lâmina estéril em um ponto da camada de células. Todas as células a partir desse ponto são removidas, gerando um espaço inteiro sem células. Esta variação da metodologia visa eliminar variáveis interferentes, como o *scratch* irregular presente na metodologia tradicional, bem como facilitar a mensuração da migração celular para a área livre de células. (LARA-REYES et al, 2020). A figura 2 ilustra a metodologia de *Razor scrape assay.*

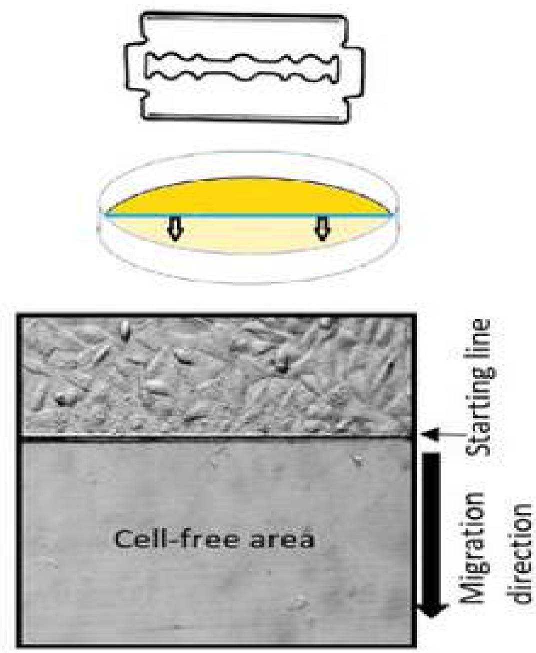


Figura 2: *Razor scrape assay*. Uma lâmina estéril é utilizada para eliminar toda uma área da monocamada de células. A camada adjacente então começa a migrar para o espaço livre. Fonte: LARA-REYES et al, 2020.

2.1.2 *Transwell Assay*

O estudo dos eventos que ocorrem na cicatrização também deve levar em consideração não apenas a migração celular, mas outros fatores que possam ser reproduzidos *in vitro*. A quimiotaxia de fibroblastos pode ser mensurada através da técnica *Transwell assay* usando uma câmara de Boyden, um aparato desenvolvido pelo pesquisador em 1962. Nessa técnica, uma determinada quantidade de fibroblastos é semeada em um poço dividido em dois compartimentos separados por uma membrana semipermeável. Na parte inferior do poço são adicionados compostos quimiotáticos. Assim, as células migram da parte superior para a inferior através da membrana. Após 24h, as células que não migraram são removidas com *swab* e são contadas apenas células que migraram para a parte inferior do aparelho (MONSUUR et al, 2016).

2.1.3 *Electric cell-substrate impedance sensing*

A técnica Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS™) avalia a adesão e a propagação das células analisadas (ZHANG et al, 2017). No ensaio, a monocamada confluente é submetida a correntes elétricas originadas de um eletrodo acoplado na base do poço. Quando as células aderem ao eletrodo, a corrente elétrica é fisicamente bloqueada, gerando uma impedância elétrica. Desta maneira, os parâmetros celulares podem ser mensurados em tempo real através da leitura de correntes elétricas subsequentemente aplicadas e fornecer dados sobre morte, migração, e proliferação celular (CUI et al, 2017).

O ECIS oferece uma vantagem sobre os ensaios de cicatrização tradicionais como o *scratch assay*: monitora o comportamento celular em tempo real, excluindo a necessidade de observação ao microscópio. O ECIS fornece dados do comportamento celular na medida em que eles vão ocorrendo (ÉVORA et al, 2017). A metodologia de ECIS pode ser usada para analisar a integridade e cicatrização da barreira hemato-encefálica com precisão (GU et al, 2018), efeitos de citocinas no processo de reparo epitelial (SZASZI et al, 2012), e micro movimentação de células-tronco (WANG et al, 2021), para citar alguns exemplos.

2.2 Ensaios 3D

Os ensaios 2D oferecem uma visão do processo cicatricial e da dinâmica de migração celular. Entretanto, como destacado anteriormente, fatores importantes como a matriz extracelular e a interação fisiológica de tipos celulares durante o reparo, geralmente não conseguem ser reproduzidos no ensaio 2D. Já as técnicas 3D se mostram como uma alternativa cada vez mais utilizada porque possibilitam um estudo mais aprofundado com uma avaliação mais abrangente dos eventos fisiológicos da cicatrização (KIEFER et al, 2017).

Modelos de pele artificiais são frequentemente usados para uma análise mais detalhada da dinâmica celular que ocorre naturalmente *in vivo*. Usando os protocolos de

testes de cicatrização neste modelo, é possível observar com mais exatidão os complexos mecanismos de cicatrização (HENSLER et al, 2019).

A microscopia de força atômica (MFA) é um método que avalia a topologia e as propriedades da superfície analisada, podendo operar de três modos diferentes: contato, não contato e contato intermitente. A MFA pode ser usada para observar os processos de cicatrização através de elastogramas que mensuram a formação de fibras de colágeno e outros eventos teciduais (OZKAN et al, 2016).

Esqueletos (scaffolds) de biopolímeros vêm ganhando espaço na área de cultivo celular 3D. Os biopolímeros de origem animal contêm todos os componentes bioquímicos presentes na célula e podem auxiliar na compreensão de processos fisiológicos (DUVAL et al, 2017). Além dos biopolímeros vários formatos de scaffolds podem ser usados para cultivar diversas células animais (MURPHY, 2017).

3 I ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Em testes preliminares de novos fármacos ou compostos naturais, é essencial que seja mensurada a capacidade citotóxica com o intuito de analisar a concentração ideal entre a biossegurança e o efeito desejado. Para tanto, os testes realizados em culturas de células possuem ampla gama de ensaios que analisam a quantidade de células vivas ou mortas, proliferação e atividade enzimática.

3.1 MTT *([3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5-difenil] tetrazolium)*

O ensaio mais utilizado para estudos de viabilidade celular *in vitro* é o teste de redução do brometo de [3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5-difenil] tetrazolium (MTT). Este ensaio baseia-se na capacidade da oxiredutase das células em reduzirem o tetrazolium (de coloração amarela) a seu sub-produto formazan, de coloração púrpura; ou seja, apenas as células viáveis e funcionais reduzem o tetrazolium. A quantificação da viabilidade se dá pela leitura do formazan gerado em 540 nm. Como a relação entre a coloração produzida e a viabilidade celular é proporcional, o ensaio de MTT permite quantificação de células vivas (BAHUGUNA et al, 2017). A figura 3 ilustra a reação do teste com o MTT.

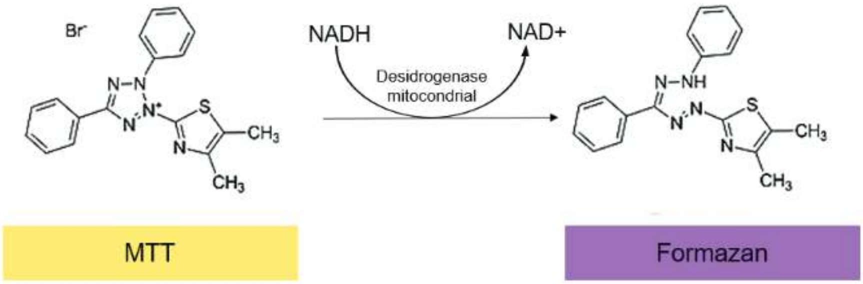


Figura 3: Princípio da técnica de MTT. [3-4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5-difenil] tetrazolium. O reagente é reduzido por desidrogenase mitocondrial ao formazan. FONTE: EMBRAPA, 2018.

Um dos cuidados que devem ser tomados quando se utiliza o MTT é adequá-lo ao estudo. Atualmente, sabe-se que o ensaio de viabilidade parece não ter muita exatidão quando se trata de análise de inibição de crescimento por polifenóis ou em contagem de células tratadas por radioterapia. No segundo caso, a radiação leva a hiperativação da atividade mitocondrial, criando mais formazan, o princípio da técnica. Evidentemente, sob essas condições, a viabilidade de células não pode ser quantificada (RAI et al, 2018). Apesar da limitação, o ensaio MTT possui baixo custo e fácil execução, sendo ideal para análises citotóxicas.

3.2 Ensaio por exclusão de corante

Os ensaios por exclusão de corante se baseiam no princípio de permeabilidade da membrana celular de células mortas. Células inviáveis, que têm sua membrana comprometida, são coradas, enquanto as células viáveis não reagem com o corante. Dessa maneira, os ensaios por exclusão de corantes são ideais para a contagem de morte celular. O corante mais utilizado nesse ensaio é o Tryplan blue; entretanto, outros corantes também são úteis, como eritrosina B e Congo Red. Este tipo de procedimento tem a vantagem de funcionar com baixo número de células, é rápido e quimiossensível. No entanto, o teste por exclusão de corante requer células em suspensão, não sendo recomendado para culturas em monocamadas, exceto se as células forem previamente tripsinizadas e colocadas em suspensão (ASLANTURK, 2017).

3.3 Ensaios fluorimétricos

A metodologias fluorimétricas de quantificação de viabilidade celular oferecem vantagens quando comparadas aos ensaios colorimétricos, pois são significativamente mais sensíveis e reprodutíveis. Esses ensaios podem ser utilizados em culturas de células aderidas, em monocamadas e em suspensão. A leitura do resultado pode ser feita por vários aparatos, entre eles, microscópio fluorescente, citometria de fluxo e fluorímetros

(RISS et al, 2016). Um dos ensaios fluorimétricos mais famosos é o baseado em resazurina. A resazurina, substância de coloração azul e baixo potencial fluorescente, é convertida em resorufina, de cor rosa com intensa fluorescência. A conversão ocorre no meio intracelular, provavelmente pela atividade de enzimas redutoras presentes na mitocôndria, citosol e microssoma de células viáveis (CHEN et al, 2017).

4 | ENSAIOS *IN VIVO*

Considerando-se os ensaios com animais, as espécies mais utilizadas são rato, camundongo, porco e coelho. Parnell & Volk (2019) relataram uma tendência recente do aumento do uso de camundongos e ensaios com seres humanos, entretanto estudos com a indução de feridas na região dorsal de ratos wistar são muito frequentes na literatura. Entretanto, as limitações específicas de cada espécie devem ser levadas em consideração para a extrapolação para pacientes humanos.

Um modelo com a inserção de ímãs na região subcutânea de ratos Sprague-Dawley gerando uma necrose na pele (após 5–7 dias) foi proposto como modelo para avaliação de úlceras por pressão (SAMI & ADBELLATIF, 2020).

Os ensaios de cicatrização e caracterização de lesões de pele *in vivo* podem fornecer dados sobre o tecido em seu ambiente natural, considerando suas interações com o sangue, outras camadas da pele e estresse ambiental (JOODAKI & PANZER, 2018). Evidentemente, o ambiente completo oferece resultados muito mais acurados sobre a real natureza do fenômeno estudado, representando o passo anterior aos testes clínicos em seres humanos. Os estudos *in vivo* devem, entretanto, passar pela aprovação de comitês de ética especializados que avaliam parâmetros como relevância, tipo de estudo e tipo de invasividade que a metodologia acarreta (MYERS et al, 2016). Os estudos de cicatrização *in vivo* geralmente avaliam o efeito de um determinado tratamento em feridas induzidas artificialmente acompanhado da análise histoquímica ou histopatológica do tecido no decorrer da retração da lesão.

4.1 Avaliação de retração da lesão

Após a aprovação do comitê de ética animal, sujeitos experimentais, geralmente ratos e camundongos são submetidos a lesões artificiais. Os animais são anestesiados e a região dorsal ou pernas são depiladas. Em seguida é feita uma incisão cirúrgica ou queimadura na pele, normalmente medindo 1-2 cm de diâmetro. As feridas então podem ser tratadas com um produto ou composto e os resultados comparados com um grupo controle positivo ou negativo. Periodicamente, são realizadas as medidas das áreas da lesão para o cálculo do percentual de retração. Esse modelo experimental é utilizado na avaliação dos efeitos de compostos isolados, extratos, curativos e aplicados sobre feridas cirúrgicas (PERINI et al, 2015), queimaduras (EHTERAMI et al, 2018). Para simular as

condições de feridas crônicas, as lesões são induzidas em animais diabéticos (SARI et al, 2018) ou ooforectomizados (DUARTE et al, 2020).

4.2 Análises histológicas e histoquímicas

Metodologias histológicas e histoquímicas permitem a avaliação do tecido cicatrizado, com o propósito de mensurar fenômenos como migração fibroblástica e infiltração de células do sistema imune, formação de fibras colágenas e detecção de componentes da matriz extracelular.

As técnicas baseadas no uso de corantes são bastante populares em análises de tecidos de lesões na pele. Picrosirius red é um dos exemplos de corantes usados para avaliar a formação de colágeno do tipo I, substância essencial para o processo de reparo tecidual. Quando aplicado e analisado sob luz polarizada, o picrosirius red mostra fibras colágenas do tipo I em coloração amarelo-avermelhada, enquanto fibras de colágeno do tipo III, considerado componente intermediário do processo cicatricial e de baixa resistência, são observadas em verde (COELHO et al, 2018). O corante tricrômico de masson baseia-se no mesmo princípio, podendo identificar vários componentes da matriz extracelular, entretanto, a coloração pode ter um desaparecimento rápido. Logo, o corante picrosirius red é o indicado para análise de fibras colágenas de tecidos cicatriciais (COSTA et al, 2019).

A coloração clássica por eosina-hematoxilina (HE) também pode fornecer informações importantes sobre o tecido analisado. No caso de análises de cicatrização, a HE pode permitir a observação de áreas de inflamação e quantificação de células do sistema imune, como neutrófilos polimorfonucleares, a angiogênese e a proliferação fibroblástica (SARI et al, 2018). Além de técnicas de coloração, podem ser utilizados ensaios imunohistoquímicos. Através do emprego de anticorpos para proteínas específicas, é possível visualizar a quantidade e morfologia das mesmas no tecido cicatrizado (DRIFKA et al, 2016).

4.3 Indução de condições patológicas

Algumas condições particulares do indivíduo podem retardar o processo de cicatrização. Entre elas, o diabetes é uma doença intimamente relacionada com reparos teciduais lentos e ineficazes. O diabetes é uma patologia metabólica que provoca a elevação da glicemia sanguínea. A hiperglicêmica eleva a viscosidade do sangue e dificulta significativamente a circulação, principalmente nas extremidades dos membros inferiores. Portanto, os mecanismos que dependem da circulação sanguínea, como a cicatrização, não ocorrem de forma satisfatória. Feridas e úlceras são comuns em indivíduos diabéticos (ex. pé diabético) podendo muitas vezes levar a amputação de membros e aumento significativo de mortalidade (OKONKWO & DIPIETRO, 2017).

Para o estudo do reparo tecidual em organismos diabéticos, muitas vezes sujeitos

experimentais como ratos e camundongos são submetidos ao processo de indução de diabetes. Essa condição geralmente é criada em laboratório através da injeção de aloxana e estreptozotocina, ambas as substâncias possuem efeitos tóxicos seletivos sobre as células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. Outras metodologias de indução de diabetes podem ser empregadas, como a infecção por vírus indutores da patologia ou o uso de animais geneticamente modificados (RADENKOVIC et al, 2016). Outra condição induzida em laboratório que interfere com o processo de cicatrização é a retirada cirúrgica de ovários de ratas. A deficiência de hormônios femininos como o estrógeno, é bastante relacionada ao envelhecimento precoce da pele e a um processo de reparo tecidual lento ou inadequado bem como a produção diminuída de colágeno dos tipos I e III (HORNG et al, 2017).

5 | AVALIAÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS CICATRIZANTES

A lesão da pele representa um perigo para o organismo humano, e os mecanismos que trabalham no reparo da lesão devem ser rápidos para prevenir maiores problemas. Povos das mais diversas eras e culturas frequentemente já usavam plantas e seus metabólitos para acelerar a cicatrização ou tratar lesões crônicas (MUNIANDY et al, 2018). Os extratos e metabólitos de plantas medicinais podem ser testados em ensaios de cicatrização *in vitro,* conforme apresentado nas seções anteriores.

Atualmente existem vários estudos que evidenciam o potencial cicatrizante de diversas plantas medicinais. Dentre os numerosos exemplos, a *Aloe vera* (babosa) apresenta efeitos com a redução do dano tecidual e cicatrizante. O gel de babosa contém o polissacarídeo acemanana e uma série de vitaminas, antioxidantes e minerais essenciais para processos fisiológicos (NIMMA et al, 2017). Atribui-se ao gel de babosa propriedades de rejuvenescimento celular e outras funções fisiológicas como a capacidade de reduzir níveis de glicose sanguínea em ratos diabéticos (WAHEDI et al, 2017). O gel de *Aloe vera* é bastante usado em aplicações tópicas e orais e é efetivo tanto em organismos normais ou diabéticos. Sugere-se que o tratamento com o gel ou extratos acentua a atividade de fatores de crescimento, a angiogênese, a produção de fibroblastos e a deposição de colágeno (HORMOZI et al, 2017). A tabela 2 apresenta dados de alguns estudos que analisaram os efeitos da *Aloe vera* em ensaios de cicatrização *in vitro.*

Tipo de análise	Ensaios utilizados	Resultados	Autores
Efeito do gel de A. *vera* L. na expressão gênica e proteica de TGFβ1 e bFGF	MTT, Real-time PCR, ELISA.	Não tóxico. Ambos os genes mostraram picos de expressão após 12h se tratados com 100 e 150μg do gel. Entretanto, após 24 os níveis de expressão se mostraram inferiores ao grupo controle. O mesmo ocorreu com a expressão proteica.	HORMOZI et al, 2017
Efeito do extrato aloesina na regeneração e migração celular	MTT, *Scratch assay*;	Aloesin não demonstrou toxicidade; culturas celulares tratadas com aloesin mostraram oclusão da fenda mais rapidamente; proteínas que contribuem para a migração celular se mostraram up reguladas com o tratamento.	WAHEDI et al, 2017
Efeito cicatrizante de gel de *Aloe muth-muth* em queratinócitos	MTT, *Scratch assay*, Ensaio de migração celular.	Apenas em concentração de 1,3 mg/ml foi encontrada viabilidade estatisticamente significativa menor que o grupo controle. A oclusão da fenda no scratch assay se mostrou mais rápida em culturas tratadas com o gel;	FOUCHÉ et al, 2020
Eficácia da aloína no tratamento de trauma agudo	MTT; *Transwell assay*; *Tube formation assay*; Ensaio de migração celular; Análise de ciclo celular;	Houve proliferação celular em algumas linhagens tratadas com aloína; O tratamento com aloina aparenta promover a saída da célula em G0/G1 e entrada na fase S; A aloína promoveu angiogênese acentuada; Migração celular se mostrou mais eficiente em doses mais elevadas de aloína; A migração celular foi mais rápida e evidente no grupo experimental.	LI et al, 2017

Tabela 2: Ensaios de cicatrização in vitro com *Aloe vera.*

Apesar do amplo emprego da *Aloe vera* como fitoterápico mais utilizado para na cicatrização de feridas (GARCIA-ORUE et al, 2017), outras plantas também são extensamente avaliadas. A tabela a seguir compila alguns estudos e métodos utilizados para avaliação de plantas medicinais (calêndula e barbatimão) preconizadas no Formulário de fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2021).

Planta	animal/linhagem celular	Ensaios utilizados	Autores
Calendula officinalis L.	Queratinócitos e fibroblastos de pele humana	Ensaios de mudança de motilidade eletroforética, qRT-PCR, ELISA e *Scratch Assay.*	NICOLAUS et al, 2017
Calendula officinalis L.	Fibroblastos de camundongo albino Swiss 3T3 e fator de crescimento derivado de plaquetas como controle positivo	*Scratch Assay* com emprego de mitomicina C para diferenciar os processos de proliferação e migração celular.	FRONZA, et. al., 2009
Calendula officinalis L.	Indução de feridas na região dorso-cervical de ratos Wistar	Avaliação macroscópica da ferida, análise morfométrica e histológica.	PARENTE, et al., 2009
Calendula officinalis L.	Avaliação *in vitro* em fibroblastos da linhagem L929 e ensaio *in vivo* através de incisões cirúrgicas no dorso de ratos Wistar	Análise da citotoxicidade através do ensaio da apoptose e necrose. Estudo histopatológico das lesões e avaliação do índice de cicatrização.	OKUMA, 2013
Stryphnodendron adstringens	indução de lesão em ratos diabéticos- ferida na região dorsal	Análises histológicas, avaliação do migração celular, proliferação de queratinócitos e do fator de crescimento endotelial.	PINTO et al, 2015
Stryphnodendron adstringens	indução de lesão em ratos diabéticos e cultura de fibroblastos	análises histológicas, citotoxicidade, scratch assay, proliferação de fibroblastos.	AGUIAR et al, 2021
Stryphnodendron adstringens	indução de lesão em ratos com ligadura de veia femoral	análises histológicas: proliferação vascular, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos, fibras colágenas e epitelização.	COELHO, et al. 2010

Tabela 3: Estudos de cicatrização in vivo e in vitro de plantas medicinais preconizadas do Formulário de Fitoterápicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre as metodologias de estudos de cicatrização destacam-se os modelos *in vitro* e *in vivo*. Os testes de cicatrização *in vitro* são realizados comumente com culturas de células, geralmente fibroblastos e queratinócitos. O scratch assay é amplamente difundido e aceito como modelo de avaliação do potencial cicatrizante. Os modelos *in vivo,* em sua grande maioria, utilizam a indução de uma lesão na pele de animais de laboratório em condições normais ou patológicas (ex. diabetes), visando retardar o processo de cicatrização. Os tecidos da lesão são analisados aplicando-se testes histoquímicos ou histológicos. Os modelos *in vitro* e *in vivo* são muito úteis na avaliação do efeito cicatrizante de plantas medicinais na forma de extrato bruto, frações e compostos isolados.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, P. S, et al. **Benefits of *Stryphnodendron adstringens* when associated with hydrogel on wound healing in diabetic rats**. Clinical Phytoscience. v.7 (22), p. 3-12, 2021.

ASLANTURK, O. S. **In vitro cytotoxicity and cell viability assays: Principles, Advantages, and Disadvantages.** InTechOpen. p. 1-17, 2017.

BAHUGUNA A., et al. **MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug.** Bangladesh Journal of Pharmacology v.12, p. 115-118, 2017.

BRASIL. **Formulário de fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª Ed., Brasília, 2021, p. 223.

CHEN, J. L., et al. **Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays.** Biotechnology and Bioengineering. v. 115, p. 351-358. 2017.

COELHO, J. M. et al. **O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos**. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões. v. 37 (1), 2010.

COELHO, P. G. B., et al. **Evaluation of dermal collagen stained with picrosirius red and examined under polarized light microscopy.** Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 93 (3), p. 415-418, 2018.

COSTA, G. M., et al. **Picrosirius red e tricrômico de masson como ferramentas para detecção de fibras colágenas em pele de cães com dermatopatologias endócrinas.** Ciência Animal Brasileira. v. 20, p.1-10. 2019.

CUI, Y., et al. **Real-time monitoring of skin wound healing on nano-grooves topography using electric cell-substrate impedance sensing (ECIS).** Sensors and Actuators B: Chemical. v. 250, p. 461-468, 2017.

DE LESO M. L., et al. **An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay.** Bioscience Reports. v. 38 (5), p. 1-9, 2018.

DRIFKA, C. R., et al. **Comparison of picrosirius red staining with second harmonic generation imaging for the quantification of clinically relevant collagen fiber features in histopathology samples.** Journal of histochemistry and Cytochemistry. v.64 (9), p. 519-529, 2016.

DUARTE, P. M et al. **Systemic lithium chloride administration improves tooth extraction wound healing in estrogen-deficient rats**. Brazilian Dental Journal. v. 31, p. 640-649, 2020.

DUVAL, K., et al. **Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture.** Physiology. v.32, p. 266–277, 2017.

EHTERAMI, A., et al. **In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model.** International Journal of Biological Macromolecules. v. 117, p. 601-609, 2018.

EMBRAPA. **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA 2018**. Comunicado técnico, nº 427, 2018.

EMING, S. A., et al. **Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation.** Science Translational Medicine. v. 6, p. 265, 2014.

ÉVORA, A., et al. **The effect of anthocyanins from red wine and blackberry on the integrity of a keratinocyte model using ECIS**.The Royal Society of Chemistry- Food & Function. v. 8, p. 3989-3998. 2017.

FRONZA, M. et al. **Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts.** Journal Of Ethnopharmacology. v. 126, p. 463-467, 2009.

GARCIA-ORUE, I.,et al. **Novel nanofibrous dressings containing rhEGF and *Aloe vera* for wound healing applications.** International Journal of Pharmaceutics. v. 523(2), p. 556-566, 2017.

GOTTRUP, F., et al. **Models for use in wound healing research: A survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue.** Wound Repair and Regeneration. v. 8 (2), p. 83-96, 2000.

GRADA, A.; et al. **Research techniques made simple: Analysis of collective cell migration using the wound healing assay.** Journal of Investigative Dermatology. v. 137, p. 11-17, 2017.

GU, A. Y., et al. **In vitro wounding models using the electric cell-substrate impedance sensing (ECIS)-Z technology.** Biosensors. v. 8 (4), p. 90, 2018.

HENSLER S., et al. **Establishment and initial characterization of a simple 3D wound healing model.** Current Directions in Biomedical Engineering. v. 5 (1), p. 581-584, 2019.

HORMOZI, M., et al.**The effect of aloe vera on the expression of wound healing factors (TGFb1 and bFGF) in mouse embryonic fibroblast cells: In vitro study.** Biomedicine & Pharmacotherapy. v. 88, p. 610-616, 2017.

HORNG, H. C., et al. **Estrogen effects on wound healing.** International Journal of Molecular Sciences. v. 18 (11), p. 2325, 2017.

HULKOWER, K. I. & HERBER, R. L. **Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery** . Pharmaceutics. v. 3 (1), p. 107-124, 2011.

JOHNSTON, S. T., et al. **Quantifying the effect of experimental design choices for in vitro scratch assays.** Journal of Theoretical Biology. v. 400, p. 19-31, 2016.

JOODAKI, H & PANZER, M. B. **Skin mechanical properties and modeling: A review.** Proc IMechE Part H: Journal of Engineering in Medicine. v. 00, p. 1-21, 2018.

KATT, M. E., et al. **In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform.** Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. v. 4, 2016.

KIEFER, A. K., et al. **Image acquisition and planimetry systems to develop wounding techniques in 3D wound model.** Current Directions in Biomedical Engineering. v. 3 (2), p. 359–362, 2017.

KRAMER, N., et al; **In vitro cell migration and invasion assays.** Mutation Research. v. 152, p. 10-24, 2013.

LARA-REYES, J. A.,et al. **Razor scrape assay, an alternative variation to wound and healing assays.** MethodsX. v. 7, p. 1-6, 2020.

LI, L. J., et al. **Evaluation of efficacy of aloin in treating acute trauma in vitro and in vivo.** Biomedicine & Pharmacotherapy. v. 88, p. 1211-1219, 2017.

MONSUUR., H. N.; et al. **Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing in vitro.** Journal of Biomechanics. v. 49, p. 1381-1387, 2016.

MUNIANDY, K., et al. **In vitro wound healing potential of stem extract of *Alternanthera sessilis.*** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. v. 2018, p. 1-13, 2018.

MURPHY, A. R., et al. **Scaffolds for 3D in vitro culture of neural lineage cells.** Acta Biomaterialia. v. 54, p. 1-20, 2017.

MYERS, D. K., et al. **From In vivo to In vitro: The medical device testing paradigm shift.** ALTEX. v. 34 (4), p.479-497, 2016.

NICOLAUS, C., et al. ***In vitro* studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts.** Journal of Ethnopharmacology. v. 196, p.94-103, 2017.

NIMMA, V. L., et al. **Holistic Healing through herbs: Effectiveness of A*loe vera* on post extraction socket healing.** Journal of Clinical and Diagnostic Research. v. 11 (3), 2017.

OKONKWO, U. A. & DIPIETRO, L. A. **Diabetes and wound angiogenesis.** International Journal of Molecular Sciences. v. 18 (7), p. 1419, 2017.

OKUMA, C.H. **Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos.** (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.

OZKAN, A. D., et al. **Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior.** Micron. v. 89, p. 60-76, 2016.

PARENTE, L.M.L et al. **Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais**,** Botucatu. v.11 (4), p. 383-391, 2009.

PARNELL, L. K. S., VOLK, S. W. **The evolution of animal models in wound healing research: 1993–2017**. Adv Wound Care. v. 8 (12), p. 692-702, 2019.

PERINI, J. A.; et al. **Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study.** BMC complementary and alternative medicine. v. 15, 203, p. 2015.

PINTO, S. C. G, et al. ***Stryphnodendron adstringens*: Clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rat**s. Planta Medicinal. v. 81, p.1090-1096, 2015.

RADENKOVIC, M., et al. **Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. v. 78, p. 13-31, 2016.

RAI, Y., et al. **Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition.** Scientific Reports. v. 8, 1531. 2018.

RISS, T. L., et al. **Cell viability assays.** In: Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004–2013.

ROTHEN-RUTISHAUSER, B., et al. In **vitro models of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of particulate matter.** Expert opinion on drug metabolism & toxicology. v. 4 (8), p.1075-1089**,** 2008.

Diana G SAMI, D.G., ABDELLATIF, A. **Histological and clinical evaluation of wound healing in pressure ulcers: a novel animal model**. Journal of Wound Care. v. 29, p.11, 2020.

SARI, Y., et al. **A comparative study of the effects of *Nigella sativa* oil gel and *Aloe vera* gel on wound healing in diabetic rat.** Journal of Evidence-Based Integrative Medicine. v. 23, p.1-6, 2018.

SHEDOEVA, A., et al. **Wound healing and the use of medicinal plants.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2019.

STAMM, A., et al. **In vitro wound healing assays – state of the art.** Bionanomaterials. v.17(1-2), p.79-87, 2016.

SZASZI, K., et al. **Epithelial wound healing and the effects of cytokines investigated by ECIS. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing.** Cancer Metastasis - Biology and Treatment. v. 17(1), p.131-17, 2012.

WAHEDI, H. M., et al. **Aloesin from *Aloe vera* accelerates skin wound healing by modulating MAPK/Rho and Smad signaling pathways in vitro and in vivo.** Phytomedicine. v. 28, p. 19-26, 2017.

WANG, L., et al. **Synergistic effect of highly aligned bacterial cellulose/gelatin membranes and electrical stimulation on directional cell migration for accelerated wound healing.** Chemical Engineering Journal. v. 424, 2021.

WILHELM, K. P., et al. **Models of wound healing: an emphasis on clinical studies**. Skin Research and Technology. v. 23 (1), p. 3-12, 2017.

XU, G. M., et al. **Dual effects of atmospheric pressure plasma jet on skin wound healing of mice.** Wound Repair and Regeneration. v. 23 (6), p.878-884, 2015.

ZHANG. X, et al.**The influence of the electrode dimension on the detection sensitivity of electric cell–substrate impedance sensing (ECIS) and its mathematical modeling**. CUNY academic works. (437), 2017.

CAPÍTULO 15

A IMPORTÂNCIA DAS RIZOBACTÉRIAS PARA A CONSERVAÇÃO DA *Parkia multijuga Benth*

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 22/12/2021

Ila Nayara Bezerra da Silva
Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém – Pará
https://orcid.org/0000-0003-3346-7531

Monyck Jeane dos Santos Lopes
Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – Pará
https://orcid.org/0000-0003-3092-6683

Beatriz Silva Santiago
Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém - Pará
https://orcid.org/0000-0002-8376-5484

Ely Simone Cajueiro Gurgel
Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Belém - Pará
https://orcid.org/0000-0002-9488-7532

RESUMO: A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo e dispõe de grande relevância ecológica devido a diversidade de espécies animais e vegetais. Por isso é importante conservar a biodiversidade vegetal das florestas nativas e os ecossistemas, com intuito de gerar equilíbrio entre a humanidade e a natureza. Uma biotecnologia em grande potencial para preservar as espécies da floresta Amazônica são as rizobactérias. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR) são microrganismos que habitam a rizosfera e são capazes de potencializar o desenvolvimento vegetal. A espécie *Parkia Multijuga* Benth., popularmente conhecida como faveira, paricá de terra-firme; bajão; faveira arara tucupi, pertence à família Fabaceae, é nativa da floresta Amazônica, e possui grande importância econômica e ecológica por conta de sua utilização em áreas degradadas. O presente estudo objetiva revisar sobre os efeitos benéficos das rizobactérias em plantas, o que poderia demonstrar seu potencial uso em *Parkia Multijuga* Benth.
PALAVRAS-CHAVE: PGPR, faveira, rizobactérias.

RHIZOBACTERIA IMPORTANCE IN *Parkia multijuga* Benth. CONSERVATION

ABSTRACT: Amazon is the largest tropical forest in the world and has great ecological relevance due to the diversity of animal and plant species. That is why it is important to conserve the plant biodiversity of native forests and ecosystems, in order to create a balance between humanity and nature. Biotechnology with great potential to preserve species in the Amazon rainforest is rhizobacteria. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are microorganisms that inhabit the rhizosphere and are capable of enhancing plant development. *Parkia Multijuga* Benth is the Fabaceae family and is native to the Amazon forest. This species has great economic and ecological importance due to its use in degraded areas. And is known as faveira and paricá de terra-firme. The present study aims to review the beneficial effects of rhizobacteria on plants, which could demonstrate their potential use in *Parkia Multijuga* Benth.
KEYWORDS: PGPR, faveira, rhizobacteria.

1 | INTRODUÇÃO

A área de floresta brasileira corresponde a 58,5% do Brasil, com área de 497.962.509 ha. Sendo, 98% de florestas naturais e 2% de florestas plantadas (SNIF, 2020). A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo e dispõe de grande relevância ecológica devido a diversidade de espécies animais e vegetais, além de seus diversos ecossistemas (REIS et al., 2019). Por isso é importante conservar a biodiversidade vegetal das florestas nativas e os ecossistemas, com intuito de gerar equilíbrio entre a humanidade e a natureza.

Dentre as espécies florestais nativas da Amazônia há a *Parkia multijuga* Benth*.,* conhecida como faveira e paricá-de-terra-firme no amazonas. Essa espécie ocorre em quatro estados no Brasil: Amazonas, Mato Grosso, Pará e Rondônia. Pertence à família Fabaceae, podendo atingir até 40 m de altura e 100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) na idade adulta. Possui tronco cilíndrico levemente tortuoso, sua casca pode medir até 10mm de espessura, com copa globosa e folhas compostas bipinadas que medem até 50 cm de comprimento (CARVALHO, 2008). A faveira possui grande importância ecológica, por conta de seu rapido crescimento, sendo assim utlizada para recuperação de área degradadas. Na indústria, por conta de sua madeira leve, sua utilidades são para produção de celulose, papel, fabricação de compensados, caixotaria, móveis e brinquedos (CARVALHO, 2008; BRAGA et al., 2021).

O desenvolvimento das plantas sofre influência de diversos fatores, e um deles é do microbiota do solo. Sabe-se que no solo há diversos microrganismos, como as bactérias, que podem causar efeitos negativos e positivos nas plantas, e suas nomeações são de acordo com os efeitos que eles causam nas plantas. Dentre os benéficos, há as rizobactérias que são capazes de controlar fitopatógenos e paralelamente potencializar o crescimento das plantas (GOSWAMI et al., 2016; LOPES et al., 2021a). Pesquisas mostram que o uso de microrganismos benéficos aumentou o crescimento em *Schizolobium amazonicum* (SIVIERO et al., 2008), *Eucalyptus urograndis* (MOREIRA; ARAÚJO, 2013) e *Acacia auriculiformis* (MUTHUKUMAR; UDAIYAN, 2017). A utilização de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR) se tornou uma das biotecnologias que pode ser utilizada para acelerar o crescimento e diminuir o custo da produção de plantas (LOPES et al., 2021b). Portanto, esse capítulo tem por objetivo revisar sobre os efeitos benéficos das rizobactérias em plantas, o que poderia demonstrar seu potencial benéfico no crescimento da faveira.

2 | REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância das espécies florestais nativas

A Amazônia é a maior floresta tropical do mundo e possui grande importância

ecológica por conta da diversidade de espécies animais e vegetais, além de seus diversos ecossistemas (REIS et al., 2019). A área de floresta brasileira equivale a 58,5% do Brasil, com área de 497.962.509 ha. Sendo, 98% de florestas naturais e 2% de florestas plantadas (SNIF, 2020).

Quando se fala em conservação de espécies florestais, em específico dos recursos genéticos das espécies nativas da floresta amazônica, surge desafios, tanto pela dimensão territorial da floresta, quanto pelas informações de suas espécies, pois os dados adquiridos ainda são insuficientes. A conservação em *Situ* de uma espécie não possibilitará a conservação de toda variabilidade genética da espécie (RIBEIRO et al., 2016). Ribeiro et al. (2016) mostra a importância da preservação das biodiversidades vegetais nativas, e dos ecossistemas, de formas que haja equilíbrio entre a humanidade e a natureza. Exibe que os usos de forma sustentável são os mais viáveis para o estágio em que se encontra os recursos genéticos das florestas. Por isso, é fundamental estudar espécies florestais nativas, uma vez que a conservação de todas as espécies é praticamente impossível.

2.1.1 Parkia multijuga (Benth)

Dentre as espécies florestais amazônicas há as do gênero *Parkia*, no qual a maioria das espécies possui grande potencial econômico, além de serem muito importantes para recuperação de áreas degradadas e preservação (CARVALHO, 2008; BRAGA et al., 2021, LOPES et al., 2021c). O gênero *Parkia* faz parte da família Fabaceae, foi classificado por Robert Brown, um botânico britânico, no ano de 1826. É representado por aproximadamente 35 espécies de distribuição Pantropical (OLIVEIRA; HOPKINS, 2020). A região da bacia amazônica é o principal centro de diversidade taxonômica e morfológica desse gênero, com ocorrência de mais de 56% de espécies (OLIVEIRA; HOPKINS, 2020).

A espécie *Parkia multijuga* Benth. é vulgarmente conhecida no Amazonas como faveira e paricá de terra-firme; em Mato grosso, bajão; no Pará, faveira arara tucupi; e em Rondônia, pinho cuiabano (Figura 1a). A espécie ocorre nos estados do Acre, Amazonas, Moto grosso, Pará, Rondônia (CARVALHO, 2008; LEÃO et al., 2019; OLIVEIRA; HOPKINS, 2020; BRAGA et al., 2021), e é classificada como espécie pioneira (LOPES et al., 2021c).

Suas folhas são recompostas, alterna, podem medir até 50 cm de comprimento; as pinas podem medir de 10 a 15 cm de comprimento; já o pecíolo é pubérulo, engrossado em sua base possuindo presença de glândula; a raque contém glândulas circulares nos entrenós; seus folíolos podem medir de 8 mm a 10 mm de comprimento por 2,5 mm a 3mm de largura (CARVALHO, 2008; BRAGA et al., 2021); a inflorescência é do tipo capítulo globulares (Figura 1b); com flores sésseis de três tipos funcionais: férteis, nectaríferas e estaminódios da cor creme-amarelado (OLIVEIRA; HOPKINS, 2020). Possui fruto do tipo legume lenhoso que pode medir de 20 cm a 25 cm; com sementes cuneadas sendo da cor de vinho (figura 2c), e medem de 3,4 cm a 5,2 de comprimento por 1,2 cm a 1,8 de largura

(CARVALHO, 2008).

O caule pode ser reto ou um pouco tortuoso, quase cilíndrico, pode medir até 15 m de comprimento, possuindo madeira de cor clara ou amarelada, de baixa densidade (BRAGA et al., 2021). Sua casca pode medir até 10 mm de espessura; a casca interna contém exsudato de cor amarelada e roxa, e o ritidoma (casca externa) possui cor avermelhada, além de exalar forte odor de legume (CARVALHO, 2008; BRAGA et al., 2021). Por ser árvore de grande porte possui raízes tubulares, são achatadas e surgem um pouco a cima da base do tronco. São conhecidas vulgarmente como sapopemas, por serem raízes superficiais com função de sustentação (GONÇALVES; LORENZI, 2011).



Figura 1. Árvore de Parkia *multijulga* Benth. (A), inflorescência (B) e sementes (C). Fonte: Arboreo, 2020.

2.2 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

Sabemos que no solo há vários microrganismos, e uma das suas classificações se dá a partir dos efeitos que geram nas plantas, sendo favoráveis ou não. Entre os microrganismos que agem de forma benéfica na planta há as rizobactérias, que constituem um grupo amplo de microrganismos, essas bactérias ganharam essa denominação devido sua alta capacidade de colonizar o sistema radicular das plantas (GOSWAMI et al., 2016).

No século XIX iniciou-se estudos com rizobactérias não simbiônticas, utilizando-as em tratamento de sementes com objetivo de melhorar o desenvolvimento e produtividade das plantas (FREITAS, 2007). Os trabalhos com rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR) há pouco tempo se intensificaram, devido ao grande interesse de substituir os defensivos agrícolas no controle de fitopatógenos (PEREIRA et al., 2008). Além de diminuir os custos de produção, e ser uma tecnologia ecológica e economicamente viável (PEREIRA et al., 2008).

No entanto, de acordo com GOSWAMI e colaboradores (2016) quando há a inoculação de microrganismos em uma mesma espécie, porém estando em ambientes e regiões diferentes, como altitude e outras características, terá resultados distintos, pois cada planta responderá de uma forma, sendo assim seus desenvolvimentos desiguais. Há algumas décadas se sabe que ao inserir microrganismos habitantes do solo, como as rizobactérias, na rizosfera de uma planta, inoculadas em sementes ou na região foliar, terá

como algumas de suas consequências o desenvolvimento da planta, assim como controle de patógenos. (JÚNIOR et al., 2013). O que eleva a necessidade de ampliar os estudos com as rizobactérias.

As rizobactérias são responsáveis pela produção de hormônios vegetais, como as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico, assim também como poliaminas e o óxido nítrico dos reguladores de plantas (CASSÁN et al., 2014). Sendo assim, de grande importância para gerar alternativas que possibilite o crescimento da planta e seu desenvolvimento visando a redução do tempo e a melhoria da produtividade das plantas (BRUNETTA et al., 2010). Além da resistência das condições adversas que poderão advir após o plantio (BRUNETTA et al., 2010).

Estudos comprovam o êxito de micororganismos benéficos às plantas, como a inoculação de *Azospiillum brasilienses* em *Zea mays* L., as plantas se tornaram mais altas e vigorosas (PEDRINHO, 2010). O que significa que seu desenvolvimento melhora, assim plantas que possuem dificuldades para atingir sua fase adulta, possuíram mais facilidade. Cassán e colaboradores (2014) comprovam a eficácia e importância dos fito-hormônios produzidos pela rizobactérias *Azospirillum*, devido o melhoramento dos metabolismos e biossíntese das plantas. O *Bacillus spp.* apresentou excelente potencial de promover crescimento em *Eucalyptus urograndis* (MOREIRA; ARAÚJO, 2013) e em *Brachira brizantha* (ARAUJO et al., 2012). Assim, destacando-se alta capacidade de extinguir patógenos no solo e proliferar suas populações, como circunstância há produção diversos antibióticos, sideróforos e hormônios de crescimento vegetal (BENIZRI et al., 2001; SIVASAKTHI et al., 2014).

2.3 Uso de PGPR em espécies florestais

Há muitas pesquisas que mostram a eficácia do uso de rizobactérias para controle de patógenos e principalmente como promotoras de crescimento de plantas, devido as substâncias que produzem (LOPES et al., 2021). A exemplo do *Bacillus subtilis*, onde alguns isolados promoveram a inibição do desenvolvimento da bactéria fitopatogênica *Pseudomanas chicorli* (CUNHA et al., 2006). De acordo com os estudos de Moreira e Araújo (2013) isolados de rizobactérias do gênero *Bacillus* apresentaram alto potencial de promoção de crescimento de massa seca da parte aérea do *Eucalyptus urograndis*. O uso de microrganismos benéficos como *Pseudomonas spp, Pseudomanoas aeruginosa, Bacillus spp., Bacillus subtilis* e *Trichoderma stromaticum* promoveram o desenvolvimento e aumento na germinação de Cacau e Sibipiruna (MACAGNAN et al., 2009; CUNHA et al., 2013).

É comprovada que a partir da aplicação de PGPRs em mudas de espécies florestais como Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), sangria d'água (*Croton urucurana*), Mutambo (*Guazuma ulmifolia*) e Pinheiro (*Pinus taeda*), há um aumento significativo no ganho de

massa seca da região aérea e da raiz, assim como acelera seu desenvolvimento (BRUNETTA et al., 2010; BETTIO; ARAÚJO, 2015). Portanto, a introdução de PGPR em mudas de espécies florestais, promete otimizar os trabalhos de reflorestamento, conservando a biodiversidade e podendo ser uma alternativa promissora também em espécies de *Parkia*.

3 I CONCLUSÃO

O uso de biotecnologias otimiza o desenvolvimento das plantas, reduz os índices de contaminação do meio e os custos com produção, sendo considerada uma tecnologia economicamente viável. A utilização de microrganismos benéficos em plantas está crescendo, devido seu alto potencial como alternativa para auxiliar a conservação e desenvolvimento de espécies nativas. Em espécies florestais promete reduzir gastos e tempo desde a produção de suas mudas, à resistir no campo, e pode ser potencializadores do desenvolvimento de *Parkia multijuga* Benth. No entanto, há necessidade de mais estudos para verificar os resultados.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, M. M; NAVROSKI, M. C; SCHORN, L. A. **Produção de sementes e mudas: um enfoque à silvicultura**. Santa Maria: Editora. UFSM, 2018.

ARBOREO. Disponível em: hhttp://www.arboreo.net/2012/12/visgueiro-parkia-multijuga.html acesso em: 21 outubro 2021

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E., GUCKERT, A. **Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria**. Biocontrol Science and Technology, v.11, n. 5, p. 557-574, 2001.

BRAGA, D. P. P., et al. **Árvores do manejo florestal no Projeto de Desenvolvimento Sustentável Virola-Jatobá, Anapu, PA.** Brasília, Embrapa Amazônia Oriental-Livro técnico (INFOTECA-E) , 2021.

BETTIO, D. P.; ARAÚJO, F. F. *Bacillus subtilis* **in commercial substrates for production forest**. Colloquium Agrariae, v.11, p. 58-65, 2015.

BRUNETTA, J.M.F.C. et al. **Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de** *Pinus taeda*. Revista árvore, v.34, n.3, p. 399-406, 2010.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, v.3, 2008. 593p.

CASSÁN, F. VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S.. **Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus** *Azospirillum*. Journal Plant Growth Regulation, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.

CUNHA, J. F. et al. **Efeito “*in vitro*” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao** *Eucalyptus* ***spp***. Revista Árvore, v.30, n.6, p. 871-876, 2006.

CUNHA, J. F. et al. **Potencial de rizobactérias no crescimento de mudas de sibipiruna (***Caesalpinia peltophoroides* **Benth)**. Revista Árvore, v.37, n.2, p. 211-218, 2013.

FREITAS, S. S. **Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas**. Microbiota do solo e qualidade ambiental. p. 1-20, 2007.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. 2º ed, São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 2011.

GOSWAMI, D.; THANKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. **Portraying mechanics of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). A review**. Cogent food & agriculture, v. 2, n. 1, 2016.

GOMES, S. H. M., et al. **Avaliação dos parâmetros morfológicos da qualidade de mudas de** *Paubrasilia echinata* **(pau-brasil) em viveiro florestal**. Scientia Plena, v. 15, n. 1, 2019.

JÚNIOR, J. R. V. et al. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas**.1° ed, Porto velho, 2013.

LOPES, M. J. S.; DIAS-FILHO, M. B.; MENEZES NETO, M. A.; CRUZ, E. D. **Morphophysiological behavior and cambial activity in seedlings of two Amazonian tree species under shade**. Journal of Botany, 2015.

LOPES, M. J. S.; DIAS-FILHO, M. B.; GURGEL, E. S. C. **Successful plant growth-promoting microbes: inoculation methods and abiotic factors**. Frontiers in Sustainable Food Systems, v. 5, 2021b.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B.; GURGEL, E. S. C. **Biotecnologia microbiana: inoculação, mecanismos de ação e benefícios às plantas**. Research, Society and Development, v. 10, n. 12, 2021a.

LOPES, M. J. S.; ALVES, A. C. S ; OLIVA, R. A. L.; SILVA, I. N B.; DIAS-FILHO, M. B; CRUZ, E. D; GURGEL, E. S. C. **CRESCIMENTO E ALOCAÇÃO DE CARBONO EM MUDAS DE** *Parkia gigantocarpa* **CULTIVADAS SOB SOMBREAMENTO**. In: FRAGA, L. P.; SILVA, P. K. (Org.). Pesquisa e aplicação em ciências biológicas. 1ed.São Paulo: Bookerfield, 2021, p. 47-55c.

LEÃO, N. V. M. et al. **Shading improves initial growth and quality of** *Parkia multijuga* **Benth. seedlings**. Australian Journal of Crop Science. 2019.

MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. **Bioprospecção de isolados de** *Bacillus* **ssp. como potenciais promotores de crescimento de** *Eucalyptus urograndis.* Revista árvore, v. 37, n. 5, p. 933-943, 2013.

MUTHUKUMAR, T.; UDAIYAN, K. **Coinoculation of bioinoculants improve** *Acacia auriculiformis* **seedling growth and quality in a tropical Alfisol soil**. Journal of Forestry Research, v. 29, n. 3, p. 663–673, 2017.

OLIVEIRA, L. C.; HOPKINS, M. 2020. **Parkia in Flora do Brasil 2020.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23108 acesso em 23 de novembro.

PEDRINHO, E .A. N. I**dentificação e avaliação de rizobactérias em isoladas em milho**. Bragantia, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010

PEREIRA, R. M. et al. **Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais**. Revista brasileira de ciências do solo, v. 32, p. 1921-1927, 2008.

REIS, P. C. M. R; et al. **Agrupamentos de espécies da Amazônia com base em propriedades físicas e mecânicas**. Ciência florestal, v. 29, n. 1, p. 336-346, 2019.

RIBEIRO, N. P. et al. **Biodiversidade e conversação de recursos genéticos de espécies arbóreas**. Multitemas, v. 21, n. 50, p. 31-49, 2016.

SIVASAKTHI, S. et al. **Biocontrol potentiality of plant growth-promoting bacteria (PGPR) -** *Pseudomonas fluorescens* **and** *Bacillus subtillis***: A review**. African Journal of agricultural research. v. 9, p. 1265-1277, 2014.

SIVIERO, M. A. et al. **Interaction among N-fixing bacteria and AM fungi in Amazonian legume tree (***Schizolobium amazonicum***) in field conditions**. Applied Soil Ecology, v. 39, n. 2, p. 144– 152, 2008.

SNIF. **Sistema Nacional de Informações Florestais**. Disponível em: http://snif.florestal.gov.br/pt-br/os-biomas-e-suas-florestas acesso em 14 de novembro de 2021.

CAPÍTULO 16

DERIVA NATURAL DE LAS ESPECIES DEL GENERO *Scytalopus* (RHINOCRYPTIDAE: AVES, PASSERIFORMES) EN FUNCIÓN DE SU UMWELT

Data de aceite: 01/02/2022
Fecha de envío: 20/12/2021

Alejandro Correa Rueda
Biólogo Evolutivo
Santiago, Chile.
http://orcid.org/0000-0003-2067-4611

RESÚMEN: Muchos autores que han realizado estudios sobre las especies del género *Scytalopus* mencionan que son especies enigmáticas y cripticas. Se han realizado estudios sobre vocalizaciones en dos especies de *Scytalopus* en Chile y estudios de ecología evolutiva de estas especies chilenas. En estas especies afines es probable que estemos ante la presencia de una modificación adaptativa. Estos cambios "teleonómicos" que han sido provocados por influencias externas, pero que constituyen la realización de un programa incorporado que es producto de una evolución filogenética y que estarían previstos o programados en el genoma de las especies mencionadas para cada uno de los cambios ambientales y que se denomina programa abierto. Por consiguiente es probable que los diferentes armónicos y vocalizaciones de las especies del género de *Scytalopus*, han sido incorporado como un patrón conductual en continuos procesos de adaptación en su relación íntima con los respectivos cambios en sus umwelten y también como una continua deriva natural adaptándose y modificando aspectos fenotípicos en relación a las circunstancias y modificaciones de sus umwelten. Probablemente en un futuro más próximo que lejano, otros estudios avalarán lo que quiero mostrar en este ensayo y que presumiblemente las variaciones en la especiación del género *Scytalopus* dejen de ser enigmáticos y crípticos, puesto que serían originados por hibridación.
PALABRAS CLAVE: *S. magellanicus*, *S.fuscus*, Rhynocriptidae, Umwelt, Hibridación.

DERIVA NATURAL DAS ESPÉCIES DO GÊNERO SCYTALOPUS (RHINOCRYPTIDAE: AVES, PASSERIFORMES) EM FUNÇÃO DO SEU UMWELT

RESUMO: Muitos autores que tem feito estudos sobre as espécies do gênero *Scytalopus* dizem que são especies enigmático e crípticas. Se tem feito estudos sobre vocalizações em duas espécies de *Scytalopus* no Chile e estudos de ecologia evolutiva dessas espécies chilenas. Nestas espécies afins é provável que estejamos ante a presença de uma modificação adaptativa. Estas mudanças "teleonômicas" que tem sido provocadas pelas influências externas, mas fazem parte da realização de um programa incorporado que é produto de uma evolução filogenética e que seriam previstos ou programados no genoma das espécies ditas para cada uma das mudanças ambientais chamado programa aberto. Por tanto, é provável que as diferenças harmônicas e vocalizações das espécies do gênero de *Scytalopus*, tenham sido incorporadas como um padrão condutual em contínuos processos de adaptação na sua relação íntima com as respectivas mudanças em

seus umwelten e também como uma contínua deriva natural adaptando-se e modificando aspectos fenotípicos em relação à circunstâncias e modificações dos seus umwelten. Provavelmente, num futuro mais próximo, outros estudos avaliarão o que quer ser dito nesse ensaio, e presumivelmente, as variações na especiação do gênero *Scytalopus* deixe de ser "críptico", sendo originados por hibridação.
PALAVRAS-CHAVE: *S.magellanicus*, *S.fuscus*, Rhynocriptidae, Unwelt, Hibridação.

NATURAL DRIFT FROM THE SPECIES OF THE GENUS *Scytalopus* (RHINOCRYPTIDAE: AVES, PASSERIFORMES) ACCORDING TO THEIR UMWELT

ABSTRACT: Many authors who have conducted studies on the species of the genus Scytalopus mention that they are enigmatic and cryptic species. Studies have been carried out on vocalizations in two species of *Scytalopus* in Chile and on evolutionary ecology of these Chilean species. Regarding these related species, we are likely in the presence of an adaptive modification. These "teleonomic" changes. Nevertheless, they constitute the realization by external influences, but that constitute the realization of an incorporated program that is the product of a phylogenetic evolution and that would be foreseen or programmed in the genome of the mentioned species for each of the environmental changes. This is called an open program. Therefore it seems likely that the different harmonics and vocalizations of the species of the *Scytalopus* genus, have been incorporated as a behavioural pattern in continuous adaptation processes in their intimate relationship with the respective changes in their umwelten and also as a continuous natural drift adapting and modifying phenotypic aspects in relation to the circumstances and modifications of their umwelten. Probably in the near rather than distant future, other studies will support what I want to show in this essay and that presumably the variations in the speciation of the genus *Scytalopus* will presumably cease to be enigmatic and cryptic, since they would be caused by hybridization.
KEYWORDS: *S.magellanicus*, *S.fuscus*, Rhynocriptidae, Unwelt hybridization.

DERIVA NATURAL DE LES ESPÈCIES DEL GENER SCYTALOPUS (RHINOCRYPTIDAE: AUS, PASSERIFORMES) EN FUNCIÓ DEL SEU UMWELT

RESUM: Molts autors que han realizat estudis sobre les espècies del gènere Scytalopus diuen que aquestes espècies són críptiques. S'han realizat estudis sobre vocalitzacions en dues espècies de *Scytalopus* a Xil.le, així com estudis d'ecologia evolutiva d'aquestes espècies xil.lenes. En aquestes espècies afins és probable que estem en presència d'una modificació adaptativa. Aquests canvis "teleonòmics", que han estat provocats per influèncias externes, però constitueixen la realització d'un programa incorporat que és producte d'una evolució filogenètica i que estarien previstos o programats en el genoma de les espècies esmentades per a cadascun dels canvis ambientals, constitueixen el que es coneix com programa obert. D'aquesta manera és probable que els diferents armònics i vocalitzacions d'aquestes petites espècies de rinocríptids hagin estat incorporats com un patró conductual en continus processos d'adaptació en la seva relació íntima amb els respectius canvis en els seus Umwelten i també com una contínua deriva natural, adaptant-se i modificant aspectes fenotípics en relació a les circumstàncies i modificacions dels seus

Umwelten. Probablemente, en un futur més proper que llunyà, altres estudis avalaran el que vull demostrar, i presumiblement les variacions en l'especiació del gènere *Scytalopus* deixaren de ser considerades "críptiques", donat que serien originades por hibridació.
PARAULES CLAU: *S. magellanicus*, *S.fuscus*, Rhynocriptidae, Umwelt, Hibridació.

Según los estudios e investigaciones sobre vocalizaciones realizadas por Riveros & Villegas (1994): "*Scytalopus fuscus* (Dusky-Tapaculo) (Fig.1a), posee una vocalización formada por la repetición regular de notas melódicas con presencia de armónicos, el fundamental de esta nota tiene una modulación ascendente entre los 1.450 hz y los 3.900 hz con una duración que varía entre 230 y 240 ms. Mientras *S. magellanicus* (Magellanic-Tapaculo) Fig 1b), posee cinco vocalizaciones, siendo el fundamental ascendente de más intensidad, la vocalización segunda, como frecuencia de modulación superior es de 4.200 hz, 12 notas en 1.600 ms". La vocalización de más larga duración es de 35 seg. (Notas de campo no publicadas) es decir habría mayor variación de vocalizaciones por parte de Magellanic-Tapaculo. Esto permite deducir que estamos ante la presencia de una modificación adaptativa (Lorenz, 1978) y también ante la presencia de individuos de un género que ha modo de adaptación a cierta variabilidad esperable del hábitat especifico han evolucionado en forma paralela con su hábitat. Estos cambio teleonómicos (Monod, 1970) que han sido provocados por influencias externas, pero constituyen la realización de un programa incorporado que es producto de la deriva natural (Maturana & Mpodozis, 2000) y en que probablemente estarían programados en el genoma de las especies mencionadas para cada uno de los cambios ambientales, se denomina programa abierto según Mayr, (1942). De esta manera es probable que los diferentes armónicos y vocalizaciones de estas especies de *Scytalopus* son incorporados como patrones conductuales en continuos procesos de deriva natural en su relación con los cambios en sus umwelten (Correa & Mpodozis, 2008; v. Uexküll & Kriszat, 1934) o según Maturana & Mpodozis (2000) en su relación fenotipo ontogénico/ nicho ontogénico, modificando aspectos fenotípicos en relación a las circunstancias y modificaciones de sus mundos internos y circundantes (v Uexkull, 2016). De tal manera que debido a estos provocaría que las las especies de este género han tenido que incorporar algunas modificaciones en sus tipos de vocalizaciones y con frecuencias distintas a las originales consiguiendo así una concordancia con el entorno o espacio perceptual en el cual interactúa cotidianamente con las otras especies que cohabitan con ellas.

Debido a esta mayor variabilidad en las vocalizaciones de Magellanic-Tapaculo en relación con el hábitat de bosques primarios relictos del sur de Chile en congruencia con su umwelt (v.Uexküll, 1921), a debido modificar su conducta e integrar un repertorio de vocalizaciones mas variable a través de su mundo perceptual o "merkwel" (v Uexküll, 2016) y con el fin de poder diferenciarse de la alta diversidad de otras especies de aves canoras, es que estas señales efectúales a través de su mundo efectúal, que constituyen

el ensamble de aves del bosque relicto de Chiloé (Rozzi & Correa, 1987; Correa, 2007), que forma parte de su círculo funcional (v. Uexkull, 2016) y que favorece la atracción de la hembra de su especie para poder reproducirse y dar origen a nuevas generaciones. Por consiguiente es la conducta que conectada a su mundo interior de la especie de *Scytalopus* y producido mediante sus signos efectúales y preceptúales una mayor diversificación de vocalizaciones específicas para así concretar el encuentro con la pareja correspondiente. Siempre recuerdo con gran emoción aquellos proyectos de investigación, en los bosques lluviosos siempreverde de Chiloé, específicamente en la Cordillera de Piuchué: "Junto a mis colegas cuando al atardecer, me sentaba en un gran peñón que colindaba con un gran acantilado, más abajo se emplazaba el bosque nativo con su gran diversidad de géneros y especies de árboles maduros y de matorrales y arbustos del bosque nativo siempreverde primario y disfrutaba escuchando la diversidad de los cantos de las aves, que era como un gran concierto de interacciones melódicas de diferentes frecuencias. Por consiguiente era tal la diversidad de melodías que a su vez se sobreponían y saturaban la atmósfera del bosque, de tal manera que se escuchaban a varios cientos de metros de distancia desde aquel peñón". Por otro lado recuerdo en otros proyectos pasados, estudios de campo basados en las especies de la familia Rhinocryptidae, en que debíamos recorrer, islas, archipiélagos de Chiloé distancias extensas haciendo transectos y registrar la avifauna en el interior de los bosques primarios, en Chiloé (Rozzi *et al*. 1996). No obstante, tener la suerte y observar diversas aves no catalogadas en la literatura científica como por ej. un ejemplar de Chucao negro (*Scelorchilus rubecula*) con melanismo o pigmentación oscura (Observación personal), junto a un grupo de chucaos en reposo debajo de una extensa superficie de densos cañaverales de *Quila sp*. y protegidos bajo una intensa lluvia cercano a la desembocadura del río Inio con el océano Pácifico, Quellón, Chiloé. Además he observado a Magellanic-Tapaculo de una mayor longitud a los registrados hallados en la literatura científica y museos (Observación personal) en el interior de los espesos y densos bosques siempreverdes de la cordillera de la costa de Piuchué, Chiloé Insular, en que estos impresionantes bosques aún se conservan intactos.

Continuando con la deriva natural (Maturana & Mpodozis 2000), de las especies de *Scytalopus*, las especies de esta familia de rinocríptidos y en general de las aves del orden *Passeriformes* que tienen una gran plasticidad conductual (Rehkämper & Zilles. 1991) para cambiar entornos o su mundo circundante (Correa & Rozzi, 2003; Correa & Mpodozis 2008; Correa *et al.* 2008; Correa *et al.* 2021), puesto que los hemos registrado en diferentes tipos de hábitat, lo que resulta teleonómicamente favorable, es decir son "*weltoffenheit*" (abierto al mundo) (Lorenz, 1978). Generalmente las especies de esta familia tienen una conducta de curiosidad bastante desarrollada (Correa & Mpodozis, 2007; Correa *et al*. 2008). Así al frecuentar otros umwelten estas aves tienen la capacidad conductual como para modificar sus vocalizaciones y algunos rasgos fenotípicos de su plumaje (ver Correa, 2012). No obstante, Dusky Tapaculo, al vivir en hábitat relativamente abiertos como los

son los umwelten andinos y zonas más bajas y de hábitat de matorrales abiertos de la zona central del bosque esclerófilo mediterráneo con cobertura baja, se verían forzados a modificar su conducta por medio de su mundo perceptual, para vocalizar armónicos a una modulación de frecuencias ascendentes (Riveros & Villegas, 1994), siendo la vocalización de más larga duración (~ 40 seg.) (Notas de campo no publicadas), para las interacciones y el éxito reproductivo entre las parejas de estas especies en lugares moderadamente abiertos. Por otra parte he observado en varias ocasiones a machos adultos de Dusky Tapaculo con una mancha blanca en la frente (Fig. 1a), con un plumaje gris obscuro y de mayor tamaño que Magellanic Tapaculo (Observación personal) parecido al fenotipo de los individuos machos de la especie andina de *S. atratus* que se distribuye en Perú, Colombia, Ecuador y Venezuela. Los ejemplares de Dusky Tapaculo son similares a los datos registrados (morfométricos y fenotipos del plumaje) por Goodall *et al*. (1945) en los bosques fragmentados esclerófilos mediterráneos en Chile central (Observación personal), otra vez estamos ante otra modificación fenotípica en congruencia con su nicho ontogénico. No obstante, en estudios de simpatría de estas especies de *Scytalopus* en áreas relativamente reducidas y fragmentadas revelan que estas especies se han visto muy vinculadas y en estrechas interacciones entre ellas (Correa & Figueroa, 2001; Correa *et al*. 2017; Correa & Figueroa, 2003).

Según estudios de dieta (Rozzi *et al.* 1996; Correa *et al,* 2003; Krabbe & Schulenberg, 2003; Correa 2012-2013) Magellanic-Tapaculo, posee una dieta omnívora y oportunista, o sea es un ave no selectiva en lo que alimentación se refiere, lo que se refleja en una mayor congruencia con su entorno o umwelten. Por otra parte he observado a especies de Magellanic-Tapaculo aislado y en congruencia con su nicho ontogénico y su mundo circundante, en hábitat relacionado a catástrofes naturales (como lo fue el terremoto de Valdivia de 1960) en pequeñas áreas de franjas de tierra no inundadas que dejo muchas hectáreas de bosque fragmentados e inundados con algunas especies arbóreas leñosas ej. familia de las Mirtáceas y otras especies resistentes al agua, en Misquihué, cercanos al río Maullín (Correa, 2016 a), pero que al inundarse esto fragmentos estas especies han modificado su comportamiento a través de signos efectúales y perceptuales a través de los espacios perceptuales y efectúales de su mundo circundante. Se perderá entonces el significado que hace que el círculo sea funcional, extinguiéndose finalmente. Sin embargo también he observado a individuos de Magellanic-Tapaculo en bosques fragmentados, depredados por actividades antropogénicas tanto en hábitat abiertos en Chiloé Insular y bosques depredados por castores en Puerto Williams, Cabo de Hornos, nidificando y en congruencia con sus umwelten, otra vez estamos ante la presencia de modificaciones conductuales y fenotípicas (Correa, 2007; Correa 2009; Correa & Mpodozis, 2008, Correa *et al.* 2008; Correa, 2012; Correa 2012-2013; Correa, 2016 b; Correa *et al*. 2021) (Ver Fig.2 y Fig.3) en una permanente deriva natural con el mundo circundante. No obstante si no están en congruencia con su mundo perceptual y efectúal de su círculo funcional, se

extinguirán y desaparecerán inevitablemente o mediante cambios bruscos en sus mundos efectúales y perceptuales, habrán de encontrar otros círculos funcionales, para continuar su deriva natural y descendencia. Por consiguiente dependiendo de las necesidades del individuo en su círculo funcional es que la conducta actuaría como una fuerza motriz con cambios en el mundo interno de la especie (Maturana & Mpodozis, 2000; Correa, 2007; Correa & Mpodozis 2007; Correa & Mpodozis, 2008; Correa *et al.* 2008; Correa 2009; Correa 2015; Correa, 2016 b; Correa, 2017) (comparar Fig. 2 y Fig. 3, entre variable conducta y sin variable conducta), por cambios en el mundo perceptual y cambios en el mundo efectúal de la especie de ave y que regularía el genoma provocando hibridaciones y generando nuevas generaciones de individuos (hay un ejemplo en la investigación en: Correa, 2015; Correa, 2016 b; Diaz *et al.* 2018; Correa, 2021, con otras especies de *Passeriformes*, que es un estudio sobre hibridación forzada en cautiverio), produciéndose cambios en algunos rasgos del fenotipo de estas especies debido a cambios en su mundo circundante, en una constante deriva natural fenotipo ontogénico/nicho ontogénico. Por otra parte se han realizado estudios filogénicos (Krabbe *et al*. 2020), en que el tiempo de especiación y radiaciones en estas especies ha sido rápido. Me atrevería a conjeturar que hay especiación por hibridación en las especies del género *Scytalopus*, ya que son flexibles a diversificar (Cadena *et al*. 2020) lo que sería bastante interesante ya que les permitiría a los individuos de este género en una estrecha conexión con su fenotipo ontogénico/ nicho ontogénico, diferenciándose así entre estas especies de *Scytalopus* solo en algunos patrones de carácter fenotípicos al dar origen a otras generaciones producto de las hibridaciones (hibridaciones que se producen por intersección de umwelten) y que permitirían coexistir en armonía con su nuevo mundo circundante, a través de la deriva natural (Maturana & Mpodozis, 2000; Correa, 2016 b).

No obstante el cambio climático probablemente acelerara el proceso de hibridación en las especies del género *Scytalopus*. Es indispensable proteger el umwelt de estas especies del genero *Scytalopus* y las especies de otros géneros relacionados ya que son susceptibles a extinciones locales (ver Correa & Mpodozis, 2008; Correa, 2012-2013; Correa, 2021), puesto que dramáticamente Magellanic Tapaculo se extingue junto a su umwelt, todo esto debido a la acción y depredación antropogénica de los bosques de Sudamérica y la invasión de animales exóticos depredadores como el visón y depredación de los bosques por el castor canadiense en el sur de Chile (Correa, 2021). Tal vez en un futuro próximo otros estudios avalarán lo que quiero demostrar en este humilde ensayo y que presumiblemente las variaciones en la especiación del género *Scytalopus* dejen de ser especies de origen críptico y enigmático, puesto que las variaciones fenotípicas serían originados por hibridación (en el cual hay intersección de umwelten) en una constante deriva natural entre su fenotipo ontogénico y nicho ontogénico o (inenwelt/umwelt), así como ocurre en otras especies de *Passeriformes* (Correa, 2015; Correa, 2016 b; Diaz *et al* 2018).

AUTORIZACIONES/ RECONOCIMIENTOS

El autor se hace responsable de todo el contenido del trabajo. El autor agradece a dos revisores anónimos la corrección de este trabajo. A Marina Garbarino por la traducción del portugués. A D. Asperó por la traducción del resumen en Catalán. A H. Jiménez, R. Rozzi y Felipe Correa por su ayuda en el trabajo de campo. Este trabajo está dedicado a Humberto Maturana (QEPD), profesor, de cuando fui muy joven estudiante de la Universidad de Chile y agradezco sus enseñanzas y motivaciones.

REFERENCIAS

CADENA, C.D., CUERVO, A.M., CÉSPEDES, L.N., BRAVO, G., KRABBE, N., SHULENBERG, T.S., DEYBERRY, G.E., SILVEIRA, L., DEYBERRY, E., BRUMFIELD, T.R. & FJELDSA, J. 2020. **Systematic, Biogeography, and diversification of Scytalopus Tapaculos (Rhynocriptidae), an enigmatic radiation of Neotropical montane birds.** Auk. Volume 137: 1-30.

CORREA, A., ROZZI, R., ARMESTO, JJ., SCHLATTER,R. & TORRES MURA, JC. 1990. **La dieta del Chucao *S. rubecula* un passeriforme terrícola endémico del bosque templado húmedo de Sudamérica Austral**. Rev. Chilena de Historia Natural 63:197-202.

CORREA, A. & FIGUEROA JA. 2001. **Observaciones sobre la reproducción de tres rinocríptidos del bosque templado de Chiloé. Boletín Chileno de Ornitología**. Vol. Nº 8: 18-21.

CORREA, A & J. FIGUEROA.2003. **Observations of Aggressiveness and territoriality among species of Rhinocryptidae in a rain forest fragment in southern Chile**. *Ornitologia Neotropical*. 14: 121-125.

CORREA, A. & ROZZI, R. 2003. ***Scytalopus magellanicus* un generalista en el extremo sur del mundo.** VII Neotropical Ornithological Congress.. Program and Books Abstract. Editors Ornithology Neotropical. Pp. 168. Termas de Puyehue, Chile.

CORREA, A.2007. **The behaviour is a feature that implies evolutionary consequences?.** In Research Gate Online: https://www.researchgate.net/publication/332109326_Is_the_behaviour_a_feature_that_implies_evolutionary_consequences_in_the_speciation

CORREA, A. & MPODOZIS, J. 2007. **Species limits that are a true riddle for the evolution**. In Research Gate. DOI: 10.13140/2.1.4357.5689

CORREA, A., MPODOZIS, J & M. SALLABERRY. 2008. **Differences of morphological and ecological characters among lineages of Chilean Rhinocryptidae in relation an sister lineage of Furnariidae**. Nature. https://www.nature.com/articles/npre.2008.1606.1

CORREA, A. & J MPODOZIS. 2008. **Speciation of Chilean Rhinocryptidae (Avian) based on their behavior.** Nature. https://www.nature.com/articles/npre.2008.1597.2

CORREA, A. 2009. **Biological similarities between Chilean Tapaculos**. Publisher VDM Verlag. Saarbrücken, Germany. 68 p. ISBN 978-3-639-18137-1.

CORREA, A. ROSSI, D. & D. ASPERO. 2012. **Phenotype differences in juvenile plumage od churrín (Scytalopous magellanicus) of Isla Navarino, Chile**. HIBIT 2012, 7th International Symposium on Health Informatics and bioinformatics. Abstract Booklet, 19-22. April, Cappadocia, Turkey. http://f1000.com/posters/browse/summary/1090071

CORREA, A. 2012-2013. **Divergencia en el plumaje del "Churrín" juvenil (*Scytalopus magellanicus*, Gmelin) en Isla Navarino, Chile**. Bol. Ins. Cat. His. .Nat. 77:165-168.

CORREA, A. 2015: **Una Nueva especie de Fringillidae (Aves: *Passeriformes*)**. XIV Congreso para el estudio de Conservación de las Aves de México. Reserva de la Biosfera, El Cielo, Gómez Farías, Tamaulipas. Programa y Libros de resúmenes página 114. http://seduma.tamaulipas.gob.mx/wp-content/uploads/2015/09/XIC-CECAM-Programa_Resumenes.pdf

CORREA, A. 2016 (a). **Diversidad de comunidades de aves en el sur de Chile.** V Congreso Colombiano de Ornitología, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. Libros de resúmenes. http://vcongresocolombianodeornitologia.org/resumenes-orales-y-carteles

CORREA, A. 2016 (b). **Breeding success between species belonging to genus *Serinus* and *Carduelis* (Aves: Passeriformes. Fringillidae family): meeting of Umwelts in an artificial model**. Sixteenth Annual Gatherings Biosemiotics, Prague. Book Abstract. Faculty of Science Charles University, Prague, Czechoslovakia.

CORREA A, MPODOZIS J & M. SALLABERRY. 2017. **Rinocríptidos Chilenos: Especiación.** Edited by Verlag/Editorial Académica Española. Es una marca de ICS Morebook!, Bahnhofstr, 28, D-66111, Saarbrücken, Germany. ISBN: 978-3-330-09224-2.

CORREA, A, FIGUEROA J. & ROZZI, R. 2020**. Primer registro de simpatría en dos especies de *Scytalopus* (Fam. Rhinocryptidae) en Zapallar, Región de Valparaíso, Chile**. Revista Catalana de d'Ornitología. 36:79-82.

CORREA, A. 2021. **Observações do churrín magalânica (*Scytalopus magellanicus*, fam. rhinocryptidae) no extremo sul do mundo, Cabo de Hornos, Chile.** Zoologia e Meio Ambiente. Cap. 5. 56-65. Atena Editora. ISBN: 978-65-5706-755-0.

DIAZ, L., V.A. CORREA & J. NUÑEZ. 2018. **Molecular evidences of Hybridization between Serinus canaria domestica (Linnaeus, 1758) and Spinus barbatus (Molina, 1782) (Aves: Fringillidae).** Bol. de la Real Soc. Española de Hist. Nat. 112: 29-34.

GOODALL, J.D., JOHNSON, A.W. & PHILLIPPI, A.1946. **Las aves de Chile, su conocimiento y sus costumbres. Vol. 2: Passeriformes**. Platt Est. Grá. Buenos Aires.

KRABBE, N. & T.S. SCHULENBERG. 2003. **Family Rhinocryptidae (Tapaculos). Pages 748–787 in Handbook of the birds of the world**. Volume 8 (J. A. del Hoyo, A. Elliott, and D. A. Christie, Editors). Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

KRABBE, N.K., SCHULENBERG, T., HOSNER, P.A., ROSENBERG , K.V., DAVIS, T.J., ROSENBERG, G.H., LANE, D.F., ANDERSEN, M.J., ROBBINS, M.B., CADENA, C.D., VALQUI, T., SALTER, J.F., SPENCER, A.J., ANGULO, F. & FJELDSÅ, J. 2020. **Untangling cryptic diversity in the High Andes: Revision of the Scytalopus [magellanicus] complex (Rhinocryptidae) in Peru reveals three new species**. Auk. Vol. 137: 1-26.

LORENZ, K.1978. **Fundamentos de la etología. Estudio comparado de las conductas.** Eds. Paidós Ibérica. Barcelona. España. 349 pp.

MATURANA, H. & J. MPODOZIS. 2000. **El origen de las especies por medio de la deriva natural.** Re. Chi. Hist. Nat. Vol. 73 (2): 261-310.

MAYR, E.1942. **Systematics and the Origin of Species**. Columbia University Press. New York. ISBN 0-674-86250-3

MONOD, JL. 1970 **Le hasard et la nécessité, éssai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne.** Éditions du Seuil. Paris.

REHKÄMPER, G. & K. ZILLES. 1991. **Parallel evolution in mammalian and avian brains:** comparative cytoarchitectonic and cytochemical analysis.

Cell & Tissue Research 263: 3-28.

RIVEROS, G & N. VILLEGAS.1994. **Análisis taxonómico de las subespecies chilenas de *Scytalopus magellanicus* (Fam. Rhinocryptidae), Aves a través de sus cantos**. An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso 22: 91-101.

ROZZI, R & A. CORREA.1987. **Abundancia y dieta de las aves del bosque de Olivillo Chiloé, Chile.** Página R 244. Archivos de Biología y Medicina Experimentales, Órgano de la Sociedad de Biología de Chile. XXX Reunión Anual de Biología de Chile, 25-28 Noviembre 1987. La Serena, Chile. Poster, Resumen.

ROZZI, R., JJ. ARMESTO, A. CORREA, JC. TORRES-MURA & M. SALLABERRY.1996. **Avifauna of primary temperate forest of uninhabitated islands of Chiloé archipelago, Chile**. Revista Chilena de Historia Natura*l*. Vol. 69: 125-139.

UEXKÜLL, J. V.1921. **Umwelt und innenleben der tiere.** (2 Aufl.) Ed Berlin. Springer.). 224 pp.

UEXKÜLL, J. V. & KRISZAT, G.1934. **Streifzüge durch die Umwelten von Tieren und Menschen**. **Ein Bilderbuch unsichtbarer Welten**. (Sammlung:

Verständliche Wissenschaft, Bd. 21.) Berlin: J. Springer. 102 pp.

UEXKÜLL, J. V.2016. **Andanzas por los mundos circundantes de los animals y los hombres.** Ed. Cactus. Argentina.





Figura 1 (a,b). Especies del género *Sytalopus* en Chile:

b) Magellanic Tapaculo (male). a) Dusky Tapaculo (male) in *Quila sp*.

Foto: autor Ik_kil en Flickr. Dibujo: F. Klaussen R.

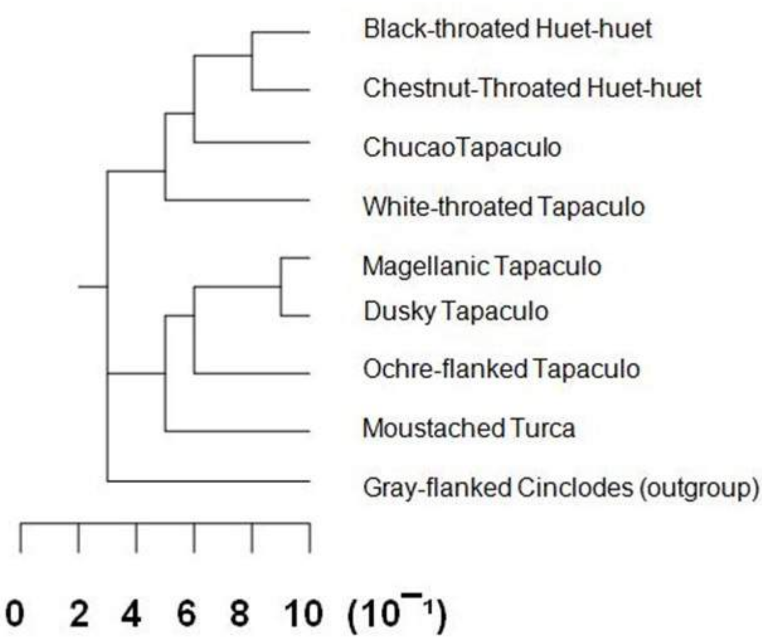


Figura 2. Árbol de similitudes (Índice de Russel & Rao) de las especies de Rhinocryptidae y del género *Scytalopus: S. magellanicus* (Magellanic Tapaculo) y *S. fuscus* (Dusky Tapaculo) observados en Chile, basado en las conductas, caracteres ecológicos y fenotipo del plumaje con el linaje hermano del orden paseriformes churrete chico (*Cinclodes oustaleti*) (Fuente: Correa *et al.* 2017). Se ve reflejado en el árbol que al incluir la variable conducta, las especies de *Scytalopus* son más parecidos.

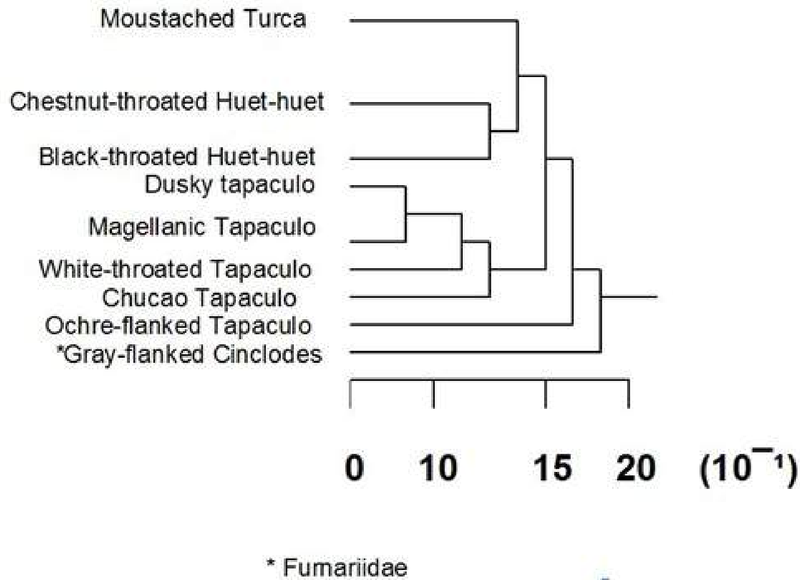


Figura 3. Árbol de similitudes (análisis de conglomerados, distancia métrica normalizada sobre 100) de las especies de rinocríptidos basado en: conducta, nichos ecológicos, morfología del plumaje con el linaje hermano “fuera de grupo” churrete chico (Fuente: Correa, 2009; Correa *et al*. 2017). En esta figura sin la variable conducta, las especies de *Scytalopus* se diferencian en algunos rasgos fenotipicos.

CAPÍTULO 17

TEMPO DE DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS FASES IMATURAS DE *Nasonia vitripennis* (WALKER, 1836) (HYMENOPTERA: PTEROMALIDAE) EM PUPAS DE *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 18/12/2021

Barbara Proença do Nascimento
Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, RJ.
http://lattes.cnpq.br/0737434153883680

Antonia de Castro Ribeiro
Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ
Rio de Janeiro, RJ.
http://lattes.cnpq.br/4412890275744117

Valéria Magalhães Aguiar
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, RJ.
http://lattes.cnpq.br/0174838161539244

RESUMO: O presente estudo teve como objetivos: (i) determinar a duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) em pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), (Diptera: Calliphoridae), utilizando dois intervalos de tempo de exposição do parasitoide ao hospedeiro; (ii) descrever as principais características morfológicas de cada fase do desenvolvimento do parasitoide; e (iii) comparar a visualização e manipulação dos imaturos de *N. vitripennis* em pupas mantidas à fresco e congeladas após o parasitismo. O primeiro experimento (T1) foi realizado em temperatura ambiente e o segundo (T2) em câmara climatizada. A relação parasitoide-hospedeiro foi de 1:3 e os tempos de exposição ao parasitismo foram de 48 horas (T1) e 18 horas (T2). O desenvolvimento de *N. vitripennis* alternou entre os experimentos T1 e T2 sendo de 13 e 14 dias, respectivamente. Os ovos de *N. vitripennis* apresentaram coloração branca e formato elipsóide. As larvas sofreram mudanças graduais no tamanho e coloração corporal, mudando da cor branca à cor amarela-escura. Uma fase de pré-pupa com coloração rósea foi observada. A fase de pupa apresentou inicialmente a coloração levemente amarelada, ocorrendo a pigmentação do tórax, cabeça e olhos, até a pupa atingir a coloração corporal negra. Os adultos apresentaram coloração verde-escura metálica e dois pares de asas membranáceas. O tempo ideal de exposição ao parasitismo, para a observação do tempo de desenvolvimento, foi de 18 horas, quando comparado com o de 48 horas.
PALAVRAS-CHAVE: parasitismo, interação parasita-hospedeiro e controle biológico.

ABSTRACT: This study aimed at: (i) determine the post-embryonic development of *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) immature in pupae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), using two different times of host-parasitoid exposure; (ii) describe the main morphological characters of the parasitoid immature phases; (iii) compare the visualization and handling of the immature maintained in fresh and frozen hosts. The first experiment (T1) was done in room temperature and the second (T2) in climate chamber. The host-parasitoid relation was 1:3 and the exposure times used were 48 hours (T1) and 18 hours (T2). The adults of *N.*

vitripennis emerged on the thirteenth day in experiment T1 and on the fourteenth in experiment T2. The eggs of *N. vitripennis* were white and with ellipsoid shape. The larvae grew in size and underwent gradual changes in color, changing from white to dark yellow. A prepupae phase was observed. The pupae showed a yellowish color, and the pigmentation started from the thorax to the abdomen, until the pupae turn black. The adults have all body in metallic dark green color and two pairs of wings. The ideal time of parasitism exposure, to observe the development time, was 18 hours, compared to 48 hours.
KEYWORDS: parasitism, host-parasitoid interaction; biological control.

1 I INTRODUÇÃO

Nasonia vitripennis (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) é uma espécie de vespa parasitoide que apresenta distribuição cosmopolita e foi encontrada no Brasil, pela primeira vez, em 1985, parasitando pupas de *Chrysomya* sp. (Fabricius, 1794) (MADEIRA; NEVES, 1985). As fêmeas demonstram preferência de postura em pupas de moscas com pupários de grande porte, como as das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae, otimizando assim suas taxas reprodutivas (ULLYETT, 1950; CARDOSO; MILWARD-DE-AZEVEDO, 1995). Por conta disso, sua utilização no controle biológico de muscóides de interesse médico-veterinário e sanitário é considerada uma alternativa eficiente e ecológica ao uso exclusivo dos inseticidas (PETERSEN; PAWSON, 1988; CARVALHO et al, 2005).

Dentre as espécies da família Calliphoridae que podem ser utilizadas como hospedeiras de *N. vitripennis* destaca-se *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974), mosca altamente sinantrópica e que encontra-se amplamente dispersa por todo o território brasileiro (PARALUPPI; CASTELLÓN, 1994; MELLO, 2005). Segundo Silva et al (2001), estes dípteros são polinizadores, porém também são atraídos por uma grande variedade de alimentos como fezes humanas e de animais, além de carne em decomposição, podendo por conta disso, veicular diversos microorganismos causadores de diversas doenças como por exemplo, enterites graves. As larvas dessa espécie também podem causar miíases teciduais não furunculosas facultativas em homens e animais, o que a torna um risco à saúde pública (GUIMARÃES et al, 1983).

Este estudo teve como objetivos: i) determinar a duração do desenvolvimento pós-embrionário de *N. vitripennis* em pupas de *C. megacephala,* utilizando-se dois intervalos de tempo de exposição do parasitoide ao hospedeiro; ii) descrever as principais características morfológicas de cada fase do desenvolvimento desse microhimenóptero; e iii) comparar a visualização e manipulação dos imaturos de *N. vitripennis* em pupas mantidas à fresco e congeladas após o parasitismo.

2 I MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Estudo de Dípteros (LED), da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). As fotomicrografias e a

dissecção dos pupários de *C. megacephala* foram realizadas no *Laboratório* Integrado de Microscopia e Análise de *Imagens* (LIMAI) da Escola de Ciências Biológicas da UNIRIO.

Em ambos experimentos, foram utilizados tubos de ensaio com capacidade de 50mL para exposição das pupas de *C. megacephala* a fêmeas de *N. vitripennis*. As fêmeas foram alimentadas com mel e hidratadas com água. Após o período de exposição, as fêmeas foram descartadas com o auxílio de um pincel e os tubos de ensaio contendo as pupas hospedeiras foram identificados e dispostos em bandejas de isopor. A dissecção dos pupários de *C. megacephala* foi feita com auxílio de lâmina de bisturi para romper o pupário e agulha hipodérmica para manipulação dos imaturos de *N. vitripennis.* A morfometria e fotomicrografia foram realizadas com auxílio de câmera acoplada em microscópio estereoscópico e do programa *Image-Pro Plus*. Para descrição das fases de desenvolvimento de *N. vitripennis* foram observadas as mudanças no tamanho do corpo, coloração, envoltório e visibilidade da segmentação de cada estágio do desenvolvimento das larvas. No estágio de pupa foram observadas somente as mudanças na pigmentação corporal.

O primeiro experimento (T1) foi conduzido sem controle das condições ambientais, que foram registradas com auxílio de um termohigrógrafo. Foram expostas três pupas de *C. megacephala*, com até 24 horas de idade, a uma fêmea de *N. vitripennis*, alocadas em tubos de ensaio vedados com tecido de náilon, totalizando 102 repetições (51 repetições utilizadas a fresco e 51 congeladas). Após 48 horas de exposição, as fêmeas foram descartadas e foi iniciado o congelamento em freezer, a -15ºC, de três repetições (nove pupários) por dia, durante 17 dias, totalizando 51 repetições. Enquanto isso, outras três repetições foram levadas, à fresco, para dissecção. Após o 17º dia de congelamento iniciou-se a dissecção das pupas de *C. megacephala*.

O segundo experimento (T2) foi realizado em câmara climatizada a 27ºC dia e 25ºC noite, 60 ± 10% de umidade relativa do ar e 14 horas de fotofase iniciada às 06h00min da manhã. Foram expostas três pupas de *C. megacephala* com até 24 horas de idade a uma fêmea de *N. vitripennis* alocadas em tubos de ensaio vedados com tecido de náilon, totalizando 51 repetições. O tempo de exposição ao parasitismo foi de 18 horas e após este período as fêmeas foram descartadas e três repetições (nove pupários) foram congeladas em freezer (-15ºC) diariamente até o 17º dia. Um mês após o término do congelamento iniciou-se a dissecção dos pupários.

Foram observadas a taxa de parasitismo da fêmea de *N. vitripennis*, a produtividade de parasitoides por hospedeiro e a razão sexual. A taxa de parasitismo foi definida pela proporção entre o número de pupas parasitadas sobre o total de pupas hospedeiras utilizadas:

$$Tp = \frac{\text{Nº de pupários com parasitoides}}{(\text{Nº total de pupários expostos ao parasitismo}) \times 100}$$

A razão sexual foi definida, segundo Silveira Neto et al (1976), pela proporção entre o número de fêmeas e o número total de insetos parasitoides utilizados, dimensionada através da fórmula:

$$Rs = \frac{N^o \text{ de fêmeas}}{N^o \text{ de fêmeas} + N^o \text{ de machos}}$$

3 I RESULTADOS

- Primeiro experimento (T1)

A visualização do parasitoide no material dissecado a fresco só foi possível no quinto dia após as 48 horas de exposição, enquanto que no material congelado a visualização foi possível logo no terceiro dia. Somente no material congelado foi observada a fase de ovo. No material à fresco a visualização do parasitoide teve início com a observação do estágio de larva, no entanto, a caracterização morfológica e o tempo de desenvolvimento foram semelhantes tanto no material a fresco quanto no congelado. A duração do desenvolvimento do estágio de ovo até a emergência do adulto foi de 13 dias, em temperatura média de 27,6 ºC (mínima de 22ºC e máxima de 31ºC) e umidade relativa do ar média de 82 ± 10% (mínima de 59ºC e máxima de 99ºC).

Os ovos apresentaram formato elipsóide, cor branca perolada e foram encontrados, em pequeno número, aderidos ao pupário, principalmente nas extremidades deste. O estágio de larva ocorreu do 4º ao 7º dia e apresentou mudanças no tamanho e coloração corporal que evoluíram de larvas pequenas, com coloração branca, a larvas robustas e escuras. Ao 8° dia foi visualizado um estágio de pré-pupa com coloração rósea e formato de larva. Do 9° ao 12° dia, foram identificadas seis alterações visíveis na coloração das pupas que apresentaram incialmente coloração levemente amarelada, a qual sofreu gradual pigmentação, iniciada com o escurecimento do tórax e, posteriormente, da cabeça e abdome, até atingir a cor totalmente negra. Os olhos apresentaram coloração branca que variou gradativamente do vermelho ao preto. As mudanças morfológicas dos imaturos podem ser observadas na Figura 1. O estágio adulto do parasitoide foi observado no 13° dia após a exposição da pupa ao parasitoide e apresentou coloração verde metálica. As fêmeas foram identificadas pelo maior tamanho corporal, em relação aos machos e, também, por possuírem asas mais longas.

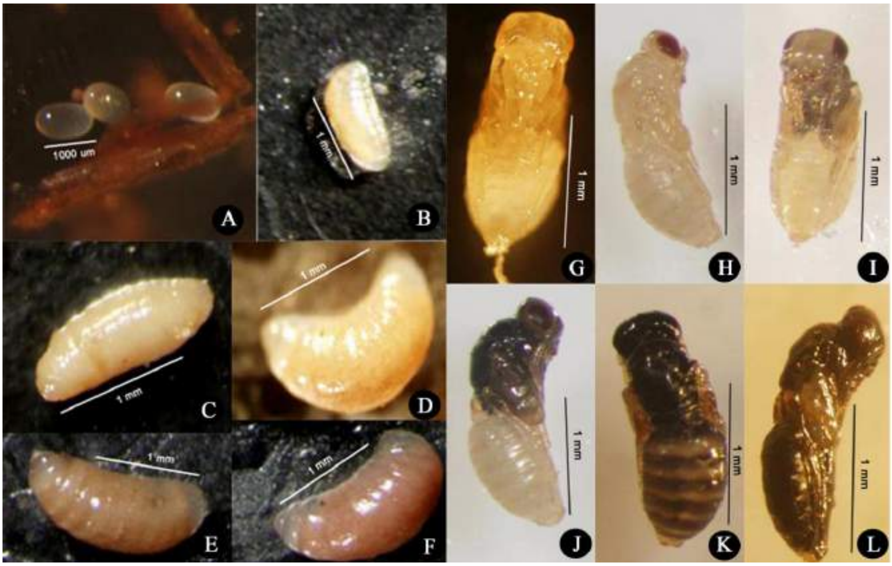


Figura 1 – Fotomicrografia em microscópio estereoscópio de imaturos de *Nasonia vitripennis* **(Walker, 1836)** em pupas de *Chrysomya megacephala* **(Fabricius, 1794).** Relação parasitoide-hospedeiro de 1:3 e tempo de exposição de 48 horas. A) ovos (3º dia). Larvas: B) 4º dia; C) 5º dia; D) 6º dia; E) 7º dia; F) pré-pupa (8º dia). Pupas: G) amarelada com olhos brancos (9º dia); H) olhos vermelhos (9º dia); I) começo de pigmentação no tórax e cabeça (10º dia); J) pigmentação total do tórax (10º dia); K) cabeça e tórax negros e abdome rajado nas cores amarela e preta (11º dia) e L) corpo totalmente pigmentado (12º dia).

- Segundo experimento (T2)

A visualização dos ovos do parasitoide foi possível a partir do primeiro dia após as 18 horas de exposição, e os imaturos apresentaram algumas características distintas das observadas no primeiro experimento. Os ovos apresentaram formato elipsóide, porém com uma coloração mais clara do que os do primeiro experimento. As larvas ocorreram do 3º ao 7º dia e apresentaram coloração mais escura, variando de branca à amarela-escura, até atingir a coloração totalmente negra. Não foi possível a visualização do estágio de pré-pupa. O estágio de pupa ocorreu do 8º ao 12º dia e foram observadas cinco mudanças na sua coloração corporal, que iniciou-se com a pigmentação do tórax, até a pupa atingir a coloração totalmente negra. Os olhos variaram da cor vermelha até a cor negra. Na Figura 2 podem ser vistas as mudanças morfológicas dos imaturos. Apenas no segundo experimento observou-se que a pigmentação em algumas pupas ocorreu inicialmente no abdome e não no tórax como nas demais. Na Figura 3 pode ser observada a pigmentação invertida observada (com início pelo abdome) assim como, a comparação entre a evolução da coloração padrão da pupa de *N. vitripennis* obtida no primeiro experimento e a coloração obtida no segundo experimento. Já os adultos apresentaram as mesmas características em ambos experimentos. A duração do desenvolvimento pós-embrionário do parasitoide

foi de 14 dias.



Figura 2 – Fotomicrografia em microscópio estereoscópio de imaturos de *Nasonia vitripennis* **(Walker, 1836)** em pupas de *Chrysomya megacephala* **(Fabricius, 1794).** Relação parasitoide-hospedeiro de 1:3 e tempo de exposição de 18 horas. A) ovos (1º dia). Larvas: B) 4º dia; C) 5º dia; D) 6º dia; E) 7º dia. Pupas: F) levemente amarelada, com olhos, mandíbula e ocelos vermelhos (8º dia); G) amarelada e começo da pigamentação do tórax (9º dia); H) cabeça e tórax pigmentados e abdome amarelado (10º dia); I) tórax negro e abdome rajado das cores branca e preta (11º dia); J) Pupa totalmente pigmentada (12º dia).



Figura 3 – Fotomicrografia em microscópio estereoscópio. Pupas de de *Nasonia vitripennis* **(Walker, 1836)** utilizando como hospedeiro pupas de *Chrysomya megacephala* **(Fabricius, 1794).** À esquerda: pigmentação das pupas iniciando **pelo abdome.** À direita: comparação entre os dois tipos de pigmentação: A) iniciando pelo abdome e B) iniciando pelo tórax.

A taxa de parasitismo foi de 60,7%, a produtividade de parasitoides por hospedeiro

foi de 8,55 indivíduos de *N. vitripennis* por pupas de *C. megacephala*. Foi observada a emergência de dípteros em 10,4% das pupas expostas ao parasitoide. Verificou-se uma diferença significativa entre o nascimento de machos e fêmeas: 152 fêmeas para 32 machos. O número de fêmeas adultas que não emergiram também foi superior ao de machos, sendo de, respectivamente, 74 e 10 indivíduos. A razão sexual calculada para a relação 1 parasitoide para 3 hospedeiros foi de 0,27.

O material congelado mostrou-se mais consistente e resistente a ação mecânica do bisturi, facilitando a retirada do pupário sem a destruição da pupa. Porém, o congelamento prolongado provocou a deterioração e o escurecimento das formas imaturas, principalmente das larvas, o que dificultou a sua manipulação e visualização. Na tabela 1 podem ser observados o tempo de desenvolvimento pós-embrionário e as características morfológicas em relação à mudança da pigmentação corporal dos imaturos de *N. vitripennis* em ambos os experimentos.

	Experimento 1 (48 horas de exposição)	**Experimento 2 (18 horas de exposição)**
Dias	**Características morfológicas**	
1	-	Ovo elipsóide e de cor branca perolada
3	Ovo elipsóide e de cor branca perolada	Larvas pequenas, com corpo esbranquiçado.
4	Larvas pequenas e com brancas	Larvas em crescimento, de coloração branca e com segmentação visível.
5	Larvas em crescimento, amareladas e com segmentação visível	Larvas robustas, amareladas e com corpo segmentado.
6	Larvas robustas, amareladas e com corpo segmentado.	Larvas robustas, negras e com corpo segmentado.
7	Larvas robustas de cor amarela escura e com corpo segmentado.	Larvas robustas, negras e com corpo segmentado.
8	Pré-pupa robusta, rósea, com aspecto de larva, corpo segmentado e extremidades transparentes.	Pupa amarelada, com olhos, mandíbula e ocelos vermelhos.
9	Pupa amarelada, com olhos, mandíbula e ocelos brancos.	Pupa amarelada, com olhos, mandíbula e ocelos vermelhos e tórax mais escuro que o abdome.
	Pupa amarelada, com olhos, mandíbula e ocelos vermelhos.	-
10	Pupa com formato do adulto, tórax negro, cabeça branca e olhos vermelhos.	Pupa com formato do adulto, com cabeça e tórax negros e abdome amarelado.
	Pupa com formato do adulto, tórax negro, cabeça acinzentada e olhos vermelho-escuros	Pupa com formato do adulto, abdome negro, tórax amarelado e olhos vermelhos.
11	Pupa com formato do adulto, com cabeça e tórax negros e abdome rajado, nas cores amarela e preta.	Pupa com tórax negro e abdome rajado nas cores branca e preta.
12	Pupa com tórax e abdome completamente negros.	Pupa com tórax, abdome e olhos completamente negros.
13	Emergência dos adultos. Machos e fêmeas de corpo verde-escuro metálico, pernas e antenas douradas.	Adultos faratos com corpo verde-escuro metálico, pernas e antenas douradas e encobertos pelo pupário.

14	-	Emergência dos adultos. Machos e fêmeas com corpo verde-escuro metálico, pernas e antenas douradas.

Tabela 1 – Tempo de desenvolvimento pós-embrionário e características morfológicas de imaturos de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) em dois tempos de exposição do parasitoide a pupas de *Chrysomyia megacephala* (Fabricius, 1974). O experimento 1 corresponde a 48 horas de exposição ao parasitismo sem controle das condições ambientais (temperatura média 27,6 °C e umidade relativa do ar média de 82 ± 10%) e o experimento 2 corresponde a 18 horas de exposição em câmara climatizada (temperatura 27°C dia/25°C noite, 60 ± 10% de umidade relativa e 14 h de fotofase).

4 I DISCUSSÃO

A duração do desenvolvimento pós-embrionário do parasitoide, de 13 e 14 dias, foi considerada acelerada quando comparada com experimentos realizados por Mello et al (2007), com a mesma relação parasitoide-hospedeiros (1:3) e em temperatura semelhante ao 2º experimento. Esses autores observaram que com o acréscimo de pupas nas relações parasitoide-hospedeiro (1:3 e 1:5) e em temperatura média de 27ºC e umidade relativa do ar de 60 ± 10%, os picos de emergência dos parasitoides foram por volta do 17º dia após a exposição. Enquanto que em relações com menos hospedeiros (1:1 e 1:2), a emergência teve picos nos 14° e 15° dias após exposição ao parasitismo. Segundo Slansky e Scriber (1985), o melhor desempenho de insetos gregários é obtido em uma faixa de densidade particular, ocorrendo declínio acima ou abaixo deste intervalo, devido a indução de condições micro-ambientais não favoráveis ao desenvolvimento destes insetos. Outros fatores importantes são condições ambientais, idade e qualidade do hospedeiro e ocorrência ou não de superparasitismo (WYLIE, 1964).

As características morfológicas e tempo de desenvolvimento dos imaturos de *N. vitripennis* foram semelhantes aos encontrados por Werren (2000). O aumento de tamanho e escurecimento das larvas foi relatado também por Whiting (1967) que associa este fato com a inabilidade de defecação da larva durante todos os seus instares, acumulando portanto mais massa. Estes dados, associados ao tempo de desenvolvimento foram utilizados para caracterizar e descrever os quatro ínstares larvais encontrados. Whiting (1967) observou-se ainda que após sua emergência, a larva se move do local de deposição do ovo, para começar a se alimentar dos fluidos do hospedeiro e permanece imóvel, na mesma posição até completar o quarto ínstar. Esse comportamento não foi observado neste estudo, pois nas pupas dissecadas à fresco, observou-se uma intensa movimentação das larvas em todos os quatro ínstares, havendo somente a imobilidade no estágio de pré-pupa rósea.

Schneiderman e Horwitz (1958) observaram um estágio de pupa branca no 8º dia após a exposição, logo após a fase de defecação da larva, seguida de uma pupa rósea. No presente estudo, não foi observada a fase de pupa rósea e sim uma fase de pré-pupa rósea com aspecto de larva, seguida de uma fase de pupa branca com formato de adulto. Também não foi possível a visualização da fase de defecação larval.

As pupas também apresentaram tempo de desenvolvimento e características morfológicas semelhantes as observadas por Werren (2000), porém nesse estudo foi feito um detalhamento maior da graduação da pigmentação das larvas. Além disso, a inversão no padrão de coloração das pupas, com a pigmentação corporal tendo início pelo abdome, não foi evidenciada por outros autores. Sugerimos que este fato esteja relacionado com o congelamento do material (Whiting, 1967; Werren, 2000).

A exposição da fêmea ao hospedeiro por 18 horas foi considerado ideal para a observação dos imaturos, em comparação com o tempo de 48 horas. Um maior tempo de exposição ao parasitismo, pode ter possibilitado diversas posturas em um mesmo hospedeiro, levando à ocorrência de vários estágios imaturos em um mesmo pupário. No tempo de 18 horas foi possível a visualização equilibrada dos mesmos estágios de imaturos no hospedeiro, o que colaborou para uma melhor caracterização da duração do desenvolvimento destes. O acervo fotográfico serviu para armazenar os dados referentes a mudança na coloração e tamanho dos parasitoides adultos e imaturos utilizados no estudo, já que a preservação provavelmente iria danificar a coloração dos exemplares testemunhas, prejudicando uma posterior análise destes dados.

A taxa de parasitismo obtida no presente estudo foi de 60,7%. Barbosa (2008) obteve um decréscimo na taxa de parasitismo quando uma fêmea de *N. vitripennis* foi exposta a mais de duas pupas hospedeiras. A diminuição da taxa de parasitismo, neste caso, pode ser explicada provavelmente pelo estresse causado pela retirada da fêmea da colônia e sua transferência para o tubo de ensaio, pela perda do atrativo olfativo da pupa durante sua manipulação, ou pela incapacidade da fêmea de parasitar as pupas no tempo de exposição ao hospedeiro (Wylie, 1966). O maior número de fêmeas de *N. vitripennis* observado pode ser explicado pela hipótese de competição local pela cópula (*local mate competition* - LMC). Esse modelo foi desenvolvido por Hamilton (1967) e pressupõe que quando somente uma fêmea ovipõe no hospedeiro, todos os machos da prole serão irmãos, o que induz a fêmea a produzir números suficientes de machos para inseminar todas as fêmeas disponíveis no local de emergência. Uma produtividade adicional de machos pode levar a competição e a um desperdício de recursos. Wylie (1965) verificou que a presença de múltiplas fêmeas numa mesma área disputando por um único hospedeiro estimulou a produção de um maior percentual de machos na progênie, concordando com o modelo LMC.

5 | CONCLUSÃO

Conclui-se que o tempo de desenvolvimento do parasitoide foi afetado pelo controle das condições ambientais, sendo mais longo em condições de temperatura, umidade relativa e de fotofase controladas. As larvas de *Nasonia vitripennis* apresentam mudanças graduais no tamanho e coloração corporal e os ovos encontram-se aderidos ao pupário do hospedeiro, o que parece ser um padrão, pois também foi observado em outros estudos.

O tempo ideal para observação do desenvolvimento pós-embrionário foi o de 18 horas de exposição do parasitoide ao hospedeiro. O material congelado, apesar de possibilitar uma melhor visualização e manipulação das formas imaturas, acaba danificando as larvas, por isso, recomenda-se o uso de material congelado por um curto espaço de tempo.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, L. S.; COURI, S. M.; COELHO, V. M. A. **Influência do aumento do número de pupas hospedeiras de *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae) no desenvolvimento do parasitóide *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera, Pteromalidae) em laboratório.** Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre, v.98, n.3, p. 339-344, 2008.

CARDOSO, D.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. **Influência da densidade de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) sobre a capacidade reprodutiva de fêmeas nulíparas de *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae).** Revista Brasileira de Entomologia, Paraná, v.39, n.4, p. 779-786, 1995.

CARVALHO, A. R.; D` ALMEIDA, J. M.; MELLO, R. P. **Dinâmica Populacional e Parasitismo de Himenópteros Parasitóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), no Rio de Janeiro, RJ.** Revista Brasileira de Entomologia, v.49, n. 1, p. 118-122, 2005.

GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N.; PRADO, A. P. **As miíases na região Neotropical: identificação, biologia e bibliografia**. Revista Brasileira de Zoologia, v.1, p. 239-416, 1983.

MADEIRA, N. G.; NEVES, D. P. **Encontro de microhimenópteros *Spalangia endius* e *Nasonia vitripennis* (Pteromalidae) em pupas de Calliphoridae (Diptera) em Belo Horizonte (MG).** *In:* XII Congresso Brasileiro de Zoologia, Campinas, p. 388-339, 1985.

MELLO, R. S., SABAGH, L. T.; AGUIAR- COELHO, V. M. **Exposição de diferentes quantidades de pupas de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) ao microhimenopteros *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae): Efeitos biológicos sobre a progénie do parasitóide.** *In:* VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu, 2007.

PARALUPPI, N. D.; CASTELLÓN, E. G. **Calliphoridae (Diptera) em Manaus, Amazonas. Padrão de atividade de vôo em cinco espécies**. Revista Brasileira de Zoologia, v.10, p. 665-672, 1994.

RUEDA, L. M.; AXTELL, R. C. **Guide to common species of pupal parasites (Hymenoptera: Pteromalidae) of the house fly and other muscoid flies associated with poultry and livestock manure**. **North Carolina Agricultural Research Service**. Technical Bulletin, v.1, 278 p, 1985.

SCHNEIDERMAN, H. A.; HORWITZ, J. **The induction and termination of facultative diapause in the chalcid wasps *Mormoniella vitripennis* (Walker) and *Tritneptis klugii* (Ratzeburg)**. Journal of Experimental Biology, v. 35, p. 520-551, 1958.

SILVA, M. S.; FONTENELLE, J. C. R.; MARTINS, R. P. **Por que moscas visitam flores?** Revista Ciência Hoje, v. 30, n. 175, p. 68-71, 2001.

SILVEIRA NETO, S. *et al*. A. **Manual de ecologia dos insetos.** Piracicaba: Ceres, 1976. 419 p.

SLANSKY, J. R. F.; SCRIBER, M. **Food consumption and utilization**. In: L. I. GILBERT. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, n. 13. Oxfor, Pergamon, 162 p, 1985.

ULLYETT, G. C. **Pupation habits of sheep blow flies in relation to parasitism by *Mormoniella vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae)**. Bulletin of Entomological Research, v.40, p. 533-537, 1950.

WERREN, J. H. Nasonia: **An ideal organism for research and teaching**. 2000. Disponível em: <http://www.rochester.edu/College/BIO/labs/WerrenLab/nasonia/undergrad.html> Acesso em: 20 dez. 2009.

WHITING, A. R. The biology of the parasitic wasp ***Mormoniella vitripennis*** (= ***Nasonia vitripennis***) (Walker). The Quarterly Review of Biology, v.42, p.333-406, 1967.

WYLIE, H. G. **Effect of host age on rate of development of *Nasonia vitripennis* (Walk.) (Hymenoptera, Pteromalidae).** Canadian Entomologist, v.96, p. 1023-1027, 1964.

WYLIE, H. G. **Effects of superparasitism on *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). Canadian** Entomologist, v.97, p. 326-331, 1965.

WYLIE, H. G. **Some effects of female parasite size on reproduction of *Nasonia vitripennis* (Walk.) (Hymenoptera: Pteromalidae).** Canadian Entomologist v.98, p. 196-198, 1966.

WYLIE, H. G. **Control of egg fertilization by *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) when laying on parasitized house fly pupae.** Canadian Entomologist, v.105, p. 709-718, 1973.

CAPÍTULO 18

ESTOQUE DE CARBONO EM FRAGMENTOS DE FLORESTAS ESTACIONAIS DO MS

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 10/01/2022

Rita de Cassia Gonçalves Marques
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/2343700970227112

Ana Beatriz Barros da Silva
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/1016417620004635

Danielly Fernandez Silva
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/1373502894970785

Gabrielli Duarte dos Santos
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/3074197564979234

Isabella Giunco Estigarribia
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/7221986350512267

Karen Rhaiza Schmidt Tavares
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/8173065532291631

Luana Daviny dos Santos Silva
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/1412295407896990

Luciana da Cruz Cortes
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/5480680841516273

Nathalya Alice de Lima
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/2494775899685308

Joab Doria Domingos
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/6849796450832683

Zefa Valdivina Pereira
Universidade Federal da Grande Dourados
Dourados – Mato Grosso do Sul
http://lattes.cnpq.br/1855232571882443

RESUMO: As florestas estacionais semideciduais e aluviais estão diminuindo devido às ações antrópicas, de modo que grandes quantidades de dióxido de carbono (CO_2) e outros gases são liberados na atmosfera. Este estudo objetivou estimar o estoque de carbono de florestas estacionais no Mato Grosso do Sul. Os dados alométricos foram aferidos em dois fragmentos florestais sendo um de Florestas Estacional Semidecídual (FES) e outro Florestas Estacional Aluvial (FEA), localizados no município de Sidrolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. O local abrange o assentamento Eldorado, sendo localizada entre as coordenadas 20º57'38,74"S, 54º 44'56,93"O e 20º57'46,75"S, 54º44'54,99". Foram demarcadas 5000m^2 em 50 parcelas quadriláteras aferindo altura e diâmetro e aplicada

em cada indivíduo a equação alométrica. O total a de carbono fixado foi 2684,38 t ha-1 e 4004,34 ha-1 para a floresta aluvial e florestas semidecidua respectivamente. Os valores de estoque de carbono das áreas amostradas são relativamente baixos, em comparação com outros estudos, principalmente nas florestas estacionais aluviais. Mesmo assim, os fragmentos analisados apresentam reservatórios de carbono que necessitam estratégias para sua conservação.
PALAVRAS-CHAVE: Sequestro de Carbono. Serviços Ambientais. Floresta Aluvial e Semidecidual.

CARBON STOCK IN SEASONAL FOREST FRAGMENTS OF MS

ABSTRACT: S Seasonal semideciduous and alluvial forests are decreasing due to human actions, so that large amounts of carbon dioxide (CO2) and other gases are released into the atmosphere. This study aimed to estimate the carbon stock of seasonal forests in Mato Grosso do Sul. The allometric data were measured in two forest fragments, one of Seasonal Semideciduous Forests (FES) and the other of Seasonal Alluvial Forests (FEA), receiving in the municipality of Sidrolândia, Mato Grosso do Sul, Brazil. The site covers the Eldorado settlement, being located between the coordinates 20º57'38.74"S, 54º44'56.93"W and 20º57'46.75"S, 54º44'54.99". 5000m2 were demarcated in 50 quadrilateral plots, measuring height and diameter, and the allometric equation was applied to each individual. The total fixed carbon a was 2684.38 t ha-1 and 4004.34 ha-1 for alluvial and semideciduous forests, respectively. The carbon stock values of the sampled areas are relatively low compared to other studies, mainly in alluvial seasonal forests. Even so, the fragments claim to have carbon reservoirs that advocate for their conservation.
KEYWORDS: Carbon Sequestration. Environmental services. Alluvial and Semideciduous Forest.

1 I INTRODUÇÃO

As florestas tropicais estão diminuindo devido às ações antrópicas, de modo que grandes quantidades de dióxido de carbono (CO^2) e outros gases são liberados na atmosfera podendo causar desequilíbrios ecológicos e climáticos globais (PACHECO & HELENE, 1990).

Por ocorrerem em solos de elevada fertilidade natural as florestas estacionais foram as mais degradadas (DURIGAN et al., 2000). As florestas estacionais semideciduais apresentam uma estrutura vegetativa marcada pelas mudanças sazonais do clima, ocasionando na perda de 20% a 50% das folhas durante o inverno seco, enquanto as florestas aluviais compreende a vegetação de cabeceiras e terraços mais antigos das calhas dos rios inserida em solo permanentemente encharcado (IBGE, 2012). Estas formações remanescentes são responsáveis por estocar grande quantidade de CO_2 em sua biomassa, contribuindo sobremaneira para o equilíbrio do estoque de carbono global (KETTERINGS et al., 2001).

A alta concentração de carbono na atmosfera fará com que a temperatura global

aumente e o metabolismo das plantas seja afetado (como as plantas C3), que possuem maior sensibilidade aos altos teores de carbono do que as plantas C4 (PACHECO & HELENE, 1990).

Para estudos de balanço global de carbono, a estimativa de biomassa acima do solo é imprescindível (KETTERINGS et al., 2001). Tal informação pode ser obtida de um ecossistema por método direto - destrutivo ou indireto - não destrutivo. O método indireto consiste na utilização de dados de inventários florestais e equações alométricas para estimativa de biomassa (HIGUCHI et al., 1998).

Este estudo objetivou analisar através de dados alométricos o estoque de carbono em diferentes fitofisionomias de florestas estacionais no Mato Grosso do Sul, contribuindo assim como subsídio para a política de Pagamento por Serviços Ambientais no estado.

2 I MÉTODO

Os dados alométricos foram aferidos em dois fragmentos florestais sendo um de Florestas Estacional Semidecídual (FES) e outro Florestas Estacional Aluvial (FEA), localizados no município de Sidrolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil. O local abrange o assentamento Eldorado, sendo localizada entre as coordenadas 20º57'38,74"S, 54º 44'56,93"O e 20º57'46,75"S, 54º44'54,99".

Em cada área foram demarcadas 50 parcelas quadriláteras de (10 m x 10 m), totalizando 5.000 m². Nestas foram aferidos altura e diâmetro de todos os indivíduos arbustivos-arbóreos vivos com CAP igual ou superior a 10 cm a 1,30 m do solo.

Para cada amostra, foi aplicada a equação alométrica proposta por Higuchi et al. (1998), que se refere ao cálculo de peso fresco da árvore. 60% deste valor corresponde ao peso seco (40% é água). O total de carbono equivale a 48% do peso seco. A equação para se calcular o peso fresco de uma árvore é: $PF= 0,0336xD^{2,171}x\ H^{1,038}$.Onde, PF = Peso fresco, em kg; D = Diâmetro à altura do peito, em cm; H = Altura total da árvore, em m. Os dados foram obtidos para 5.000m^2 e a posteriori estimado para um hectare.

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram identificados no total 1737 indivíduos nas duas formações, das quais na área de Floresta Aluvial identificou-se 759 indivíduos (ha^{-1}) e área de Floresta Estacional Semidecidual 978 indivíduos (ha^{-1}). O que resultou uma média total de carbono fixados de, 2684,38 kg/ha^{-1} e 4004,34 kg/ha^{-1}; respectivamente (Tabela 1).

Formação	Massa Fresca (Kg/5.000m²)	Massa Seca (Kg/5.000m²)	Estoque de Carbono (Kg/ 5.000m²)	Estoque de Carbono (Kg/ha^{-1})
FES		4171.19	2002.17	4004.34
FEA	4660.38	2796.22	1342.18	2684.38

Tabela 1 - Valores totais da massa seca, massa fresca e o estoque de carbono total (k/ha -1) para as áreas estudadas FES e FEA.

Fonte: Os autores.

Em comparação com outros estudos, os valores de estoque de carbono dessas duas áreas amostradas são relativamente baixos, especialmente as florestas estacionais aluviais. No estudo de Brun et al (2010), o valor da floresta estacional chega a 157,6 Mg ha^{-1}, o que também é demonstrado pelo estudo de Higuchi et al. (1998) onde peso do tronco seco corresponde a 61% de seu peso antes da secagem; e o da copa corresponde a 58% de seu peso fresco. Esses altos valores se devem ao fato de os galhos e a madeira das plantas acumulem mais biomassa do que as folhas (VOGEL et al., 2013), além disso, o clima e a alta biodiversidade de espécies vegetais são alguns dos fatores que têm maior impacto no acúmulo de biomassa.

As diferenças observadas neste estudo podem estar relacionadas a vários fatores como a metodologia utilizada à densidade dos maciços florestais encontrados nas diversas localidades, ou ainda, à própria estrutura florestal, como altura total dos indivíduos, diâmetro à altura do peito, idade, tipo de solo, nutrientes, entre outros como já sugerido por Carvalho et al. (2014).

Contudo, apesar de serem baixos, estes remanescentes representam um reservatório de carbono extremamente importante, pois contribuem para minimizar os efeitos causados pela concentração de CO_2 na atmosfera (BASS et al, 2000) e assim auxiliar a mitigar os efeitos das mudanças climáticas no mundo (GRASSI et al, 2017).

Houve diferenças significativas em relação ao estoque de carbono nas duas formações com valor -P de 0,177729. A Figura 1 evidencia estas diferenças em porcentagens.

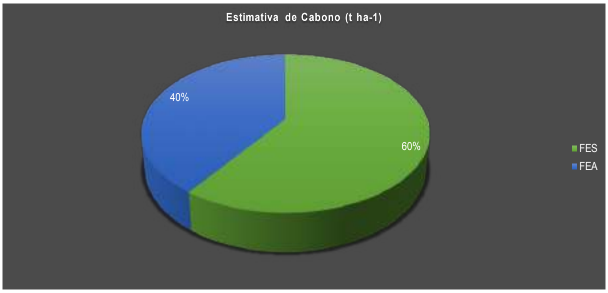


Figura 1. Porcentagens de fixação de carbono para FES e FEA.

Fonte: Os autores.

As diferenças observadas nas duas fitofisionomias podem ser explicadas pelos filtros ecológicos existentes na floresta aluvial tais como a saturação hídrica que limitam o sucesso de espécies não adaptadas, o que resulta em um baixo número de espécies e indivíduos que consequentemente afeta o estoque de carbono ao longo do tempo.

4 I CONCLUSÕES

Os filtros ecológicos observados nas florestas aluviais podem ser responsáveis pela grande diferença entre o estoque de carbono das duas áreas estudadas. Embora, neste trabalho, os valores de estoque de carbono foram baixos, os fragmentos analisados representam reservatórios de carbono e que necessitam de estratégias para sua conservação. Assim, políticas de Pagamento de Serviços Ambientais poderiam ser implantados nessa região a fim de garantir a manutenção destes remanescentes.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Educação Tutorial – PET, pela Bolsa concedida e ao CNPQ pelo apoio financeiro Processo Número 427250/2016-1.

REFERÊNCIAS

BASS, S; DUBOIS, O; COSTA, P. M; PINARD, M; TIPPER, R; WILSON, C. **Rural livelihoods and carbon management**. IIED Natural Resource Paper No.1, *[S. l.]*, n. March, p. 106, 2000. Disponível em: http://www.iied.org/bookshop.

BRUN, E. J; BRUN, F. G. K; CORRÊA, R. S; VACCARO, S; SCHUMACHER, M. V. **Dinâmica de micronutrientes na biomassa florestal em estágios sucessionais de Floresta Estacional Decidual, RS, Brasil**. Scientia Forestalis/Forest Sciences, *[S. l.]*, n. 86, p. 307–318, 2010.

CARVALHO, L. S; CERQUEIRA, R. M; SILVA, G. V; SILVA, E. R. M. **Estoque de carbono em um fragmento de floresta estacional semidecídua no município de Ribeirão Grande, São Paulo**. Bioikos, Campinas, v. 28, n. 2, p. 73-85, jul./dez., 2014.

DURIGAN, G; RODRIGUES, R. R; SCHIAVINI, I. **A heterogeneidade ambiental definindo a metodologia de amostragem da floresta ciliar**. In Matas ciliares: conservação e recuperação (R.R. Rodrigues & H.F. Leitão Filho, eds.). EDUSP, São Paulo, p.159-167, 2000.

GRASSI, G; HOUSE, J; DENTENER, F; FEDERICI, S; DEN ELZEN, M; PENMAN, J. **The key role of forests in meeting climate targets requires science for credible mitigation**. Nature Climate Change, *[S. l.]*, v. 7, n. 3, p. 220–226, 2017. DOI: 10.1038/nclimate3227.

HIGUCHI, N; SANTOS, J. D; RIBEIRO, R. J; MINETTE, L; BIOT, Y. **Biomassa da parte aérea da vegetação da floresta tropical úmida de Terra- Firme da Amazônia Brasileira**. Acta Amazônica, *[S. l.]*, v. 28 (2), p. 153–166, 1998. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/aa/v28n2/1809-4392-aa-28-2-0153.pdf.

IBGE. **Manual técnico da vegetação brasileira / Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 2012**. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv63011.pdf. Acesso em 29/07/2021.

KETTERINGS, Q. M; COE, R; NOORDWIJK, M. van; AMBAGAU, Y; PALM, C. A. **Reducing uncertainty in the use of allometric biomass equations for predicting above-ground tree biomass in mixed secondary forests**. Forest Ecology and Management, v. 146, n. 1-3, p. 199-209, 2001.

PACHECO, M. R. P. S; HELENE, M. E. M. **Atmosfera, fluxos de carbono e fertilização por CO2**. Estudos Avançados, *[S. l.]*, v. 4, n. 9, p. 204–220, 1990. DOI: 10.1590/s0103-40141990000200010.

VOGEL, H. L. M; SCHUMACHER, M. V; TRÜBY, P. **Biomassa e macro nutrientes de uma floresta estacional decidual em Itaara-RS, Brasil**. Revista Arvore, *[S. l.]*, v. 37, n. 1, p. 99–105, 2013. DOI: 10.1590/S0100-67622013000100011.

CAPÍTULO 19

DESAFIOS NA TRILHA: UM JOGO DIDÁTICO SOBRE O PASSADO E O PRESENTE DAS PTERIDÓFITAS

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 09/02/2022

Geneildes Cristina de Jesus Santos
Universidade Federal do Tocantins - UFT
Araguaína – Tocantins
http://lattes.cnpq.br/2492811010206839

Adriana Pereira da Cruz
Universidade Federal do Tocantins - UFT
Araguaína – Tocantins
http://lattes.cnpq.br/6134433772200220

Lúcia Silva Correia
Universidade Federal do Tocantins - UFT
Araguaína – Tocantins
http://lattes.cnpq.br/1332590123752052

Luciara da Silva Aguiar
Universidade Federal do Tocantins - UFT
Araguaína – Tocantins
http://lattes.cnpq.br/2582354416389673

Silvana Rodrigues Morais
Universidade Federal do Tocantins - UFT
Araguaína – Tocantins
http://lattes.cnpq.br/7184419715719112

Claudia Scareli-Santos
Universidade Federal do Tocantins - UFT
Araguaína – Tocantins
http://lattes.cnpq.br/3000305136161931
https://orcid.org/0000-0002-3243-6189

RESUMO: Neste capítulo apresentamos a descrição do jogo didático "Trilha das Pteridófitas", desenvolvido para trabalhar o tema sobre os aspectos biológicos, distribuição geográfica, importância econômica e cultural destacando sua ocorrência em sítios preservados como material fóssil no Tocantins. O jogo foi idealizado focando seu uso como um elemento didático para reforçar os conhecimentos dos alunos sobre as Pteridófitas. Para a sua confecção foi utilizado bibliográfica específica, o programa CorelDRAW x8®, ilustrações e a impressão realizada em papel sulfite. As imagens e textos foram distribuídos formando uma estrutura no formato de uma trilha com 50 divisórias sendo seis atribuídas possibilidades de avançar ou de regressar no jogo. São apresentadas 25 perguntas e respostas sobre o tema e oito cartas com curiosidades sobre o tema. A realização do jogo didático proporcionou aos alunos a inserção de tópicos novos sobre o tema de forma lúdica e descontraída; as questões direcionados a Unidade de Conservação (UC) Integral Monumento Natural das Árvores Fossilizadas do Tocantins (MONAF) reforçaram a importância do saber botânico.

PALAVRAS-CHAVE: Conhecimento**.** Jogo didático. MONAF. Samambaia.

CHALLENGES ON THE TRACK: A DIDACTIC GAME ABOUT THE PTERIDOPHYTES PAST AND PRESENT

ABSTRACT: In this chapter we present the description of the didactic game "Trail of Pteridófitas", developed to work the theme on the biological aspects, geographic distribution, economic and cultural importance, highlighting its occurrence in sites preserved as fossil material

in Tocantins. The game was designed focusing on its use as a didactic element to reinforce students' knowledge about Pteridophytes. Specific bibliography, CorelDRAW x8® program, illustrations and printing on bond paper were used for its production. The images and texts were distributed forming a structure in the form of a track with 50 divisions, six of which were assigned possibilities to advance or return in the game. There are 25 questions and answers on the topic and eight letters with curiosities about the topic. The realization of the didactic game provided the students with the insertion of new topics on the theme in a playful and relaxed way; the questions directed to the Conservation Unit (UC) Integral Natural Monument of Fossilized Trees of Tocantins (MONAF) reinforced the importance of botanical knowledge.
KEYWORDS: Didactic game. Ferns. Knowledge. MONAF.

1 | INTRODUÇÃO

O ensino de Biologia é objeto de estudo de diferentes pesquisadores, que buscam elucidar o conhecimento, diminuir a complexidade dos temas, instigar a curiosidade e promover o entusiasmo sobre a ciência da vida. Como mencionado por Ursi et al. (2019) foi graças ao encantamento pelos elementos da vida que muitos estudiosos apresentaram questionamentos e soluções para elucidar fenômenos de ocorrência cotidiana.

Apesar dos vegetais ocorrerem ao nosso redor, como beleza cênica, eles estão presentes da nossa alimentação, na medicina caseira, na elaboração de itens diversos, de saltos de sapatos, lápis, móveis a elementos decorativos, entretanto a baixa percepção dos vegetais possibilita uma ideia errônea que vegetais compõem um cenário de fundo, sem interações com os demais elementos da natureza. Esse fenômeno é chamado de "Cegueira Botânica" (WANDERSEE; SCHUSSLER, 2001).

O desafio de ensinar sobre as plantas é agravado pelo "Analfabetismo Botânico" (UNO, 2009), juntamente com fatores diversos como a falta de tempo e aptidão dos professores em preparar atividades teórico-práticas (SALATINO; BUCKERIDGE 2016; KINOSHITA et al., 2006) onde evidencie que a importância dos vegetais vai além de saber sobre os ciclos de vida e do carbono.

Como estratégias para promover uma boa qualidade do ensino de Botânica Ursi et al. (2019) destacam a apresentação de contextualização histórica e cultural, a inserção das atividades do cotidiano do educando, as abordagens sobre ética, cidadania e enfoque evolutivo, a realização de atividades de extensão entre as universidades e escolas, fornecimento de cursos para atualização e melhora na formação docente, realização de pesquisas que elucidem a problemática e apresente soluções, utilização de tecnologia a favor da educação e a realização de atividades práticas, as quais podem ocorrer em espaços formais e não formais de ensino.

Dentre as atividades práticas, a elaboração e aplicação dos jogos didáticos reúnem características importantes como baixo custo, fácil manuseio, são dinâmicos, associam informação com conhecimento de forma lúdica, permitem interações entre os alunos e com os temas, os quais podem ser direcionados a diferentes aspectos biológicos e também

trabalhados de forma interdisciplinar (CAMPOS; FELICIO; BORTOLOTO, 2003; GUEDES; FONTOURA; PEREIRA, 2003; GARCIA, 2010; SILVA; MORAES, 2011; SOUZA; BARROS, 2012; OLIVEIRA, 2016; SOARES, 2016; SCARELI-SANTOS; VULCÃO; MACIEL, 2019; CRUZ et al. 2021).

Objetivou-se desenvolver um jogo didático para trabalhar o tema Pteridófitas sobre os aspectos biológicos, distribuição geográfica, importância econômica e cultural destacando sua ocorrência em sítios preservados com material fóssil no Tocantins. O jogo foi idealizado focando seu uso como um elemento didático para reforçar os conhecimentos, dos alunos, recebidos previamente em aulas sobre as Pteridófitas.

2 I MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida por um grupo de alunas do 5º. Período do curso de Biologia (licenciatura) da Universidade Federal do Tocantins, campus Araguaína, TO, durante a disciplina de Botânica, a qual foi ministrada no formato remoto devido a pandemia. Após a explanação teórica, com aulas síncronas, sobre o tema Pteridófitas, da indicação de leituras de textos científicos complementares, foram repassadas as orientações para desenvolver um jogo didático com apresentassem as características: ser dinâmico, com perguntas e respostas sobre o tema Pteridófitas, incluindo questões sobre o cotidiano dos alunos e sobre a ocorrência do grupo vegetal no estado do Tocantins, destacando a Unidade de conservação Integral Monumento natural das árvores fossilizadas (MONAF), localizado no distrito de Bielândia, pertencente ao município de Filadélfia, a 80 Km de Araguaína.

Para elaboração das perguntas, respostas e da sessão sobre as curiosidades sobre as Pteridófitas foram consultadas bibliografias específicas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007; SANTOS; SYLVESTRE, 2006; NÓBREGA; PRADO, 2008; MONTAGNA et al., 2012; SANTOS; CHOW, 2014; ROTAVA, 2021).

3 I RESULTADOS E DISCUSSÃO

Elaboração do jogo didático

Para a confecção do jogo didático primeiramente foram formuladas as perguntas, escolhidas as imagens ilustrativas e o formato do jogo, e na sequência foram detalhadas as regras e pontuações. Em um segundo momento, com o auxílio do computador e do programa CorelDRAW x8® as imagens e textos foram distribuídos formando o jogo de tabuleiro com 50 casas, sendo que em seis são atribuídas possibilidades de avançar ou de regressar no jogo. Ao final o jogo apresentou tamanho de 100 cm de largura por 70 cm de altura e para sua a impressão foi utilizado plotter digital e papel tipo sulfite com gramatura de 120g (Fig. 1). As imagens utilizadas na ilustração do jogo Trilha das Pteridófitas foram

obtidas das publicações de Stumpf (2012), Brasil Escola (2021), Silva (2021) e também de arquivo pessoal de uma das autoras.

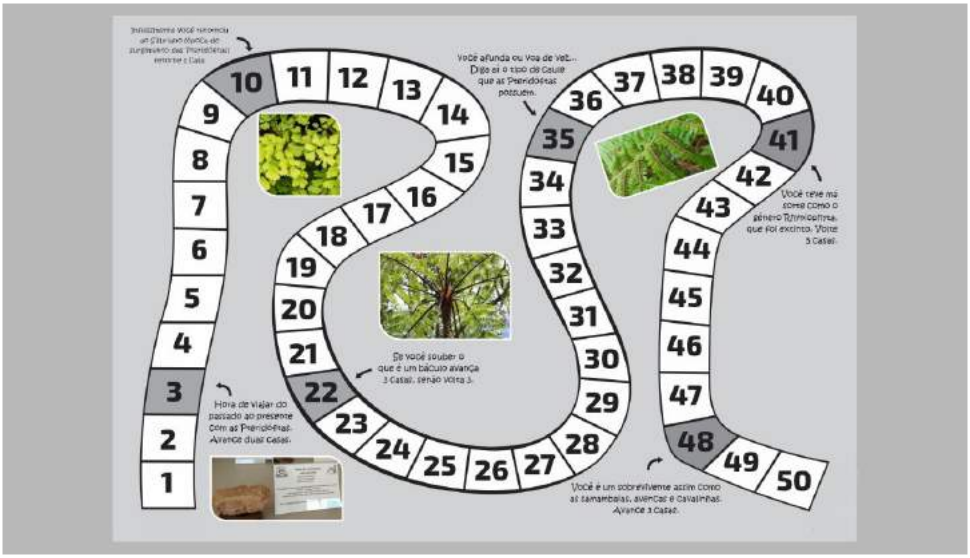


Figura 1. Vista geral do jogo didático Trilha das Pteridófitas.

Fonte: elaborada pelas autoras (2021).

As regras do jogo

O professor será o responsável pela organização dos grupos que serão compostos por cinco alunos cada. Cada grupo receberá um tabuleiro, dado e os pinos coloridos, sendo uma cor designado para cada integrante. O início da partida será definido por sorteio, bem como a sequência de participação. O aluno sorteado lançara o dado e percorrerá a trilha até a casa numérica correspondente, na sequência realizará a leitura a qual poderá corresponder a responder uma pergunta sobre o tema Pteridófitas, ou às ações de recuar ou de avançar casas na trilha. As cartas com as perguntas e respostas estarão em uma caixa junto ao aluno que está conduzindo o jogo da trilha, o qual iremos atribuir a designação de coordenador. Cada aluno lança o dado uma única vez, realiza a ação a qual foi designada na trilha e já repassa para o segundo integrante, assim sucessivamente até completar a primeira rodada. Caso o número sorteado pelo participante corresponda a uma casa numérica da trilha destinada a responder a uma pergunta, imediatamente o coordenador do jogo irá o sorteio e a leitura da pergunta e o aluno deverá responder em até dois minutos. O jogo possui o total de cinco rodadas, entretanto pode ser estender até apresentar um vencedor, característica atribuída ao aluno que finalizar primeiramente o percurso da trilha. Ao final de cada rodada é sorteada e lida uma carta com uma curiosidade

sobre as Pteridófitas.

Perguntas e respostas

Foram confeccionadas cartas com perguntas e suas respectivas respostas (Fig. 2), no total foram elaboradas 25 questões as quais estão descritas no quadro 01. Também foram elaboradas oito cartas com curiosidades sobre o tema (Fig. 3).



Figura 2. Exemplo de uma carta utilizada no jogo didático "Trilha das Pteridófitas". A: verso da carta com ilustrações de folhas; B: verso da carta com a pergunta, as quatro alternativas de resposta. O círculo em azul indica a resposta correta. Fonte: elaborada pelas autoras (2021).

Número	Questão	Resposta
01	Qual característica das Pteridófitas permitiu uma vantagem evolutiva sobre as briófitas?	**A) Aparecimento de vasos condutores** B) Semente desnudas C) Fruto protegendo as sementes D) Necessidade de água para nutrição e reprodução
02	Em que período histórico surgiram os primeiros representantes das Pteridófitas?	A) Período Devoniano; B) Período Carbonífero; **C) Período Siluriano**

03	Quais são as características dos habitats onde as Pteridófitas podem ser encontradas?	A) Locais secos e arenosos B) Locais desérticos **C) Locais sombreados e úmidos**
04	Cite o nome do período conhecido como "idade das grandes florestas", em que se encontravam principalmente as Pteridófitas?	A) Período Permiano B) Período Cambriano **C) Período Carbonífero**
05	No ciclo de vida das Pteridófitas as fases duradoura e transitória são representadas por quais estruturas?	**A) Esporófito e Gametófito** B) Sinângios e Estróbilos C) Esporocarpos e Esporângios
06	Os fósseis das Pteridófitas formaram uma substância que é utilizada até hoje para produção de calor através da sua queima. Cite qual é o nome desta substância formada a partir destes fósseis.	**Hulha ou carvão mineral**
07	As Pteridófitas correspondem a dois Clados monofiléticos. Quais são eles?	**Licófitas e Monilófitas**
08	De acordo com os registros fósseis, quando surgiram as primeiras Pteridófitas?	**Surgiram há aproximadamente 400 milhões de anos.**
09	Em qual das alternativas são apresentados exemplos de Pteridófitas ornamentais?	**A) Samambaia e avenca** B) Pinheiro de Natal e margarida C) Fava-de-bolota e roseira
10	Onde estão localizados os soros?	**Na superfície abaxial das folhas (frondes) das Pteridófitas.**

Continuação Quadro 01...		
Número	Questão	Resposta
11	Esse gênero é de samambaia aquática, que realiza simbiose com as cianobactérias no cultivo de arroz. Qual é esse gênero?	A) *Marsilea* B) ***Azolla*** C) *Psilotum*
12	O que significa dizer que as Pteridófitas são cosmopolitas?	**As Pteridófitas são cosmopolitas, ocorrendo em diversos habitats, desde florestas tropicais (Mata Atlântica e floresta Amazônica), matas de altitude ou pluviais de encosta como as serras úmidas, caatinga nordestina e ambiente salobro como os manguezais.**
13	Cite algumas das importâncias econômicas relacionadas às Pteridófitas.	**São utilizados como substrato para o cultivo de orquídeas. Algumas Pteridófitas são usadas como vermífugos. Tradicionalmente usadas na culinária oriental**.
14	Diferentemente das briófitas, as Pteridófitas apresentam características mais derivadas que permitiram as mesmas conquistarem o ambiente terrestre. São características das Pteridófitas, exceto:	**A) São as primeiras que apresentam vasos condutores de seiva;** B) Possuem rizoides, cauloides e filoides. C) São dependentes da água apenas para a nutrição.
15	Qual das opções abaixo apresenta características referes ao grupo das Pteridófitas?	A) Possuem flores, frutos, raízes e são independentes da água quanto a reprodução e nutrição. B) São avasculares e dependentes da água para reprodução. **C) São vasculares e podem usar esporos para a sua propagação**.

16	Em qual região do planeta Terra ocorre a maior diversidade de espécies de Pteridófitas?	**A diversidade das Pteridófitas é maior nos trópicos, onde cerca de ¾ das espécies são encontradas.**

Continuação Quadro 01...		
Número	Questão	Resposta
17	As Pteridófitas são encontradas em quase todas as regiões do globo terrestre. No Brasil em quais biomas encontra-se a maioria das espécies de Pteridófitas?	**Mata Atlântica e Amazônia.**
18	As plantas ornamentais se fazem presentes em boa parcela das residências brasileiras. E muitas delas por muito tempo foram cultivadas em vasos conhecidos como xaxins, elaborados a partir da espécie *Dicksonia sellowiana*, que é uma Pteridófita que atualmente está em risco de extinção e não é permitido o seu extrativismo. Entretanto existe matéria prima de outros vegetais que a substitui, dentre as alternativas apresentadas qual deles é utilizado para a fabricação de vasos semelhantes ao xaxim?	A) Bagaço de cana **B) Casca de coco** C) Subprodutos do algodão
19	A classe Equisetopsida apresenta um único gênero, o *Equisetum*, com ocorrência comum em lugares úmidos e pantanosos, possui caules fotossintetizantes e folhas diminutas. Como essa Pteridófita é conhecida popularmente:	A) Trevo de 4 folhas B) Samambaiaçu **C) Cavalinha**
20	Troncos fósseis da samambaia da espécie Psaronius brasiliensis podem ser observado em quais localidades?	**A) Os estados do Tocantins e Piauí no Brasil** B) Alasca e Rússia C) Finlândia e Noruega

21	O que é esporofilo?	**A) Folha fértil onde são produzidos os esporângios** B) uma região do raiz. C) um tipo de solo
22	Como ocorrem os esporângios?	**Os esporângios geralmente ocorrem em agrupamentos denominados soros, que podem aparecer como linhas, pontos ou manchas amplas, amarelas, laranjas, castanhas ou pretas sobre a superfície inferior da fronde.**

Continuação Quadro 01...		
Número	Questão	Resposta
23	A *Nephrolepis cordifolia*, popularmente conhecida por samambaia de metro, é uma das espécies mais cultivadas no Brasil. São apresentadas 3 afirmações sobre ela, diga qual das alternativas qual delas não é verdadeira.	A) São cultivadas em locais onde ocorre meia-sombra, em solos ricos em húmus e permeáveis. **B) As frondes (folha) podem atingir mais de dois metros de extensão.** C) Necessitam de solo pobre em nutrientes e sem água.
24	São apresentadas 3 afirmações sobre a espécie *Dicksonia sellowiana*, popularmente conhecida como xaxim ou samambaiaçu, responda qual das alternativas não é verdadeira.	**A) das suas raízes eram elaborados os vasos para cultivo de outros vegetais.** B) é uma espécie arborescente, com potencial para ser utilizada como ornamental C) é uma espécie nativa do Brasil.

25	No protalo das samambaias estão as estruturas onde são produzidos os órgãos reprodutores, quais são eles?	**Os anterídios que produzem os anterozoides (gameta masculino flagelado) e os arquegônios que formam as oosferas (gameta feminino).**

Quadro 1. Questões e suas respectivas alternativas de respostas, elaboradas para o jogo Trilha das Pteridófitas. A resposta correta está em negrito.

Apresentação do jogo

Foi utilizada a plataforma *google meet* para a apresentação e demonstração do jogo denominado trilha das Pteridófitas. Foram detalhados os aspectos da confecção e da dinâmica de aplicação do jogo em sala de aula, com participação dos demais alunos da disciplina Botânica. Ocorreu a demonstração do jogo e os questionamentos, os quais foram respondidos pela equipe. Atenção especial foi direcionada as questões da importância das espécies de Pteridófitas no cotidiano dos educandos. Surgiram discussões e perguntas associando o tema Pteridófitas com os conhecimentos adquiridos nas aulas da disciplina de Paleontologia e sobre o MONAF, sobre a importância da conservação e das pesquisas que são realizadas de enfoque nacional e internacional. Durante os comentários sobre o jogo didático, foi questionado de sobre o aspecto interdisciplinar e as respostas obtidas evidenciaram que os alunos, em sua maioria, percebem as interações sobre o conteúdo Pteridófitas em outras disciplinas cursadas no curso de graduação como Ecologia, Paleontologia e Conhecimento e realidade socioambiental.



Figura 3 Cartas do jogo “trilha das Pteridófitas” correspondente à sessão Você sabia que?

Fonte: elaborada pelas autoras (2021).

O comportamento observado dos alunos evidenciou características importantes na obtenção de êxito no ensino, destacando o domínio do conteúdo e uso de vocabulário botânico correto, interesse pelas etapas envolvidas na elaboração da atividade, curiosidade sobre as questões, associações com aprendizados em outras disciplinas, bem com o dinamismo e competição estabelecida entre os participantes. O uso de jogos didáticos proporciona momentos de descontração, aprendizagem e dinamismo no ensino de temas mais complexos, ou menos atrativos, para os alunos, como já relatados por diferentes autores, destacando Garcia (2010), Silva; Moraes (2011); Edson-Chaves et al. (2015), Matos et al. (2015), Oliveira (2016), Soares (2016), Scareli-Santos; Rodrigues (2020) e Cruz et al. (2021).

É necessário buscar alternativas didáticas para promover êxito na arte de ensinar, despertar o interesse maior pelas plantas e instigar os alunos a questionar os temas e associa-los com outras disciplinas. Promover o interesse pela de Biologia para que os educandos possam compreender sobre animais e plantas, das suas interações e importância seja no passado distante como na atualidade. É necessário questionar a importância de aprender sobre os vegetais (SALATINO; BUCKERIDGE 2016) de associar com questões do cotidiano (SILVA; CAVALLE; AQUINI, 2006; SCARELI SANTOS; VULCÃO; MACIEL, 2019),

mostrando aos alunos e professores sobre a utilização do jogo didático como recurso que pode ser utilizado como complemento da aula teórica (CAMPOS; FELICIO; BORTOLOTO, 2003; GARCIA, 2010; SCARELI-SANTOS; RODRIGUES, 2020; CRUZ et al., 2021).

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do jogo didático “Trilha das Pteridófitas” proporcionou aos alunos a inserção de tópicos novos sobre o tema de forma lúdica, participativa e descontraída; as questões direcionados aos diversos aspectos sobre o grupo das Pteridófitas, bem como as que estavam relacionadas com a Unidade de Conservação Integral Monumento Natural das Árvores Fossilizadas do Tocantins (MONAF) reforçaram a importância do saber botânico local e do cotidiano.

REFERÊNCIAS

BRASIL ESCOLA. Biologia: Pteridófita. 2021. Disponível em: https://m.brasilescola.uol.com.br/amp/biologia/pteridofitas.htm. Acesso em 10. Jun. 2021.

SOARES, P. E. A. **Dominó botânico: uma sugestão de jogo educativo para o ensino de botânica no âmbito do ensino fundamental**. TCC Curso de Biologia da UNB - campus Planaltina, DF. 65p. 2016.

SILVA, A. B. V.; MORAES, M. G. Jogos pedagógicos como estratégia no ensino de morfologia vegetal. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, vol.7, n.13; p. 1642- 1652, 2011. Disponível em: http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011b/ciencias%20humanas/jogos%20pedagogicos.pdf. Acesso em: 29 mai. 2021.

CAMPOS, L. M. L.; FELICIO, A. K. C.; BORTOLOTO, T. M. A. Produção de jogos didáticos para o ensino de Ciências e Biologia: uma proposta para favorecer a aprendizagem. **Caderno dos Núcleos de Ensino**, São Paulo, p. 35-48, 2003. Disponível em: http://www.unesp.br/prograd/PDFNE2002/aproducaodejogos.pdf. Acesso em 15 jun. 2019.

CRUZ, A. P.; SANTOS, G. C. J.; CORREIA, L. S.; AGUIAR, L. S.; MORAIS, S. R.; TEIXEIRA, R. L.; SCARELI-SANTOS, C. O jogo didático Roda Botânica: inserindo movimento e proporcionando conhecimento sobre o tema morfologia foliar. **Revista Querubim**, Niterói v. 5, n. 45 p. 04-09, out. 2021.

DIAS-BRITO, D.; ROHN, R.; CASTRO, J. C. DE; DIAS, R. R.; RÖBLER, R. Floresta petrificada do Tocantins Setentrional: o mais exuberante e importante registro florístico tropical-subtropical permiano no Hemisfério Sul. In: WINGE, M.; SCHOBBENHAUS, C.; BERBERT-BORN, M.; QUEIROZ, E.T.; CAMPOS, D.A.; SOUZA, C.R.G.; FERNANDES, A.C.S. (eds.), Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil. Brasília: CPRM. 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237607021_Floresta_Petrificada_do_Tocantins_Setentrional_O_mais_exuberante_e_importante_registro_floristico_tropical-_subtropical_permiano_no_Hemisferio_Sul_SIGEP_104.Acesso em: 03 fev. 2022.

EDSON-CHAVES, B.; OLIVEIRA, R. D.; CHIKOWSKI, R. S.; MENDES, R. M. S.; MEDEIROS, J. B. L. P. Ludo Vegetal: uma nova alternativa para a aprendizagem de Botânica. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 3, p. 194-200, jul./set. 2015. Disponível em: http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3372/1284. Acesso em 10 ago. 2021.

GARCIA, M. W. **Jogo didático como estratégia complementar ao ensino de Botânica no Ensino Médio em uma escola particular de Barretos, SP**. Monografia Universidade Presbiteriana Mackenzie, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. São Paulo, 2010. 104p.

GONÇALVES, E. G.; LORENZI, H. **Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, Nova Odessa. 2007.

GUEDES, A. G.; FONTOURA, M. T. S.; PEREIRA. M. M., Biologia limitada: Um jogo interativo para alunos do terceiro ano do Ensino Médio. In: ENCONTRO NACIONAL DE PESQUISAS EM EDUCAÇÃO EM CIÊNCIAS, 7, 2009, Florianópolis.

KINOSHITA, L. S.; TORRES, R.B.; TAMASHIRO, J. Y.; FORNI-MARTINS, E. R. **A Botânica no ensino básico**: relatos de uma experiência transformadora. São Carlos: RiMa, 2006.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. de **Plantas ornamentais do Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 4ª. Edição, Nova Odessa. 2008.

MATOS, G. M. A.; MAKNAMARA, M.; MATOS, E. C. A.; PRATA, A. P. Recursos didáticos para o ensino de Botânica: uma avaliação das produções de estudantes em Universidade sergipana. **Revista Holos**, Natal, ano. 31, v. 5, p. 213- 230, set., 2015.

MONTAGNA, T.; FERREIRA, D. K.; STEINER, F.; FERNANDES, C. D.; BITTENCOURT, R.; SILVA, J. Z.; MANTOVANI, A.; REIS, M. S. A Importância das Unidades de Conservação na Manutenção da Diversidade Genética de Xaxim (*Dicksonia sellowiana*) no Estado de Santa Catarina. **Biodiversidade brasileira**, Brasília, v. 2 n. 2 p. 25-31, ago. 2012. Disponível em: https://npft.cca.ufsc.br/files/2016/10/uc-xaxim.pdf. Acesso em 01 fev. 2021.

ROTAVA, M. **Potencial ornamental de plantas nativas da Mata Atlântica** (Bacharel em Agronomia) Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Santa Catarina, 2021. 36f. TCC. Disponível em: https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/4906. Acesso em: 02. Fev. 2022

OLIVEIRA, R. R. S. **Jogos para o ensino de Botânica: uma proposta visando a aprendizagem significativa**. Programa de Pós-Graduação em Ensino de Ciências Universidade Estadual de Goiás Anápolis, 2016. 35p.

RAVEN, P. H; EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.

ROTAVA, M. **Potencial ornamental de plantas nativas da Mata Atlântica** (Bacharel em Agronomia) Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Santa Catarina, 2021. 36f. TCC. Disponível em: https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/4906. Acesso em: 02. Fev. 2022

SALATINO, A.; BUCKERIDGE, M. “Mas de que te serve saber botânica?” **Revista Estudos Avançados,** São Paulo, v. 30, n. 87, p. 177-196, mai./ago., 2016.

SANTOS, V. S. Biologia net: Pteridófitas. Disponível em: https://m.biologianet.com/amp/botanica/pteridofitas.htm. Acesso em: 01 fev. 2021.

SANTOS, D. Y. A. C. dos; CHOW, F. A conquista do ambiente terrestre pelas plantas, a diversidade

das plantas terrestres avasculares e a origem das plantas vasculares. In: **Diversidade e evolução das plantas** [S.l: s.n.], São Paulo: USP/Univesp/Edusp, 2014.

SANTOS, M. G.; SYLVESTRE, L. S. Aspectos florísticos e econômicos das Pteridófitas de um afloramento rochoso do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, Brasília, v. 20, n.1, p. 115-124. 2006. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abb/a/dKQVtYDKMT7YFbqnNf6Xxtv/?format=pdf&lang=pt. Acesso em: 02. Fev. 2022.

SILVA, L. M.; CAVALLE, V. J.; AQUINI, Y. O professor, o aluno e o conteúdo no ensino da Botânica. Revista do Centro de Educação, v.31, n.1, p.67-80, 2006

SCARELI-SANTOS, C.; RODRIGUES, S. P. S. O uso do lúdico no ensino botânica: avaliação do jogo didático “Perfil das Sementes” pelos alunos do ensino médio de uma escola pública em Araguaína, TO. **Revista Querubim**, Niterói, v. 6, n. 42, p. 27-32, out. 2020.

SCARELI SANTOS, C.; VULCÃO, M. A. S.; MACIEL, J. C. S. Jogo didático e a disciplina botânica: o que a folha me ensina? Vamos descobrir “desfolhando”. **Revista Querubim,** Niterói, v. 38, n. 2, p. 69-73, jun. 2019.

SOUZA, D. C.; BARROS, M. D. M. **Jogos interativos: uma possibilidade no ensino de Ciências para a educação de jovens e adultos.** III Encontro Nacional de Ensino de Ciências da Saúde e do Ambiente. Rio de Janeiro. 2012.

STUMPF, M. Xaxim ou samambaia-açu. 2012. Disponível em: https://www.fazfacil.com.br/jardim/xaxim/. Acesso em: 10 ago. 2021.

TAVARES, M. V. T.; AIRES, H. A.; PIRES, E.; ROHN, R. Monumento Natural das Árvores Fossilizadas do Tocantins: contribuições e desafios. **Revista Desafios**, Palmas, v. 03, n. 02, p. 51-64, dez. 2016 Disponível em: https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios/article/view/2549/9290. Acesso em: 23 jan. 2022.

TAVARES, T. M. V.; ALENCAR, M. A.; PACÍFICO FILHO, M. Monumento Natural das **Árvores Fossilizadas do** Tocantins (MONAF): Política pública ambiental e patrimonial. **Humanidades & Inovação**, Palmas, v. 7, p. 225-244, junho 2020. **Revista** Disponível em: https://revista.unitins.br/index.php/humanidadeseinovacao/issue/view/79. Acesso em 04 fev. 2022.

URSI, S.; BARBOSA, P. P.; SANO, P. T.; BERCHEZ, F. A. S. Ensino de Botânica: conhecimento e encantamento na educação científica **Estudos Avançados**, São Paulo, v.32 n.94, p. 1-17, set./dez. 2018. Disponível em: https://www.scielo.br/j/ea/a/fchzvBKgNvHRqZJbvK7CCHc/?format=pdf&lang=ptAcesso em: 15 jun. 2021.

UNO, G. E. Botanical literacy: what and how should students learn about plants? **American Journal of Botany**, v.96, n.10, p.1753-9, out. 2009. Disponível em: https://bsapubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3732/ajb.0900025. Acesso em: 15 jan. 2022.

WANDERSEE, J. H.; SCHUSSLER, E. E. Towards a theory of plant blindness. **Plant Science Bulletin**, Columbus, v. 47, n. 1, p. 2-9, mar. 2001. Disponível em: https://botany.org/psbarchive/view/issues/lct/user/pos/7. Acesso em: 15 jun. 2019.

CAPÍTULO 20

O USO DO WEBSITE WWW.GENETICAFACIL.ORG COMO FERRAMENTA DIGITAL NO ENSINO E DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA DE ASSUNTOS RELACIONADOS À GENÉTICA

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 13/01/2022

Rogério Carlos Novais
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Formação de Professores
Rio de Janeiro – RJ
http://lattes.cnpq.br/2447837933287359

Monica Antonia Saad Ferreira
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Formação de Professores
Rio de Janeiro – RJ
http://lattes.cnpq.br/4511271309661059

RESUMO: As tecnologias digitais de informação fazem parte de nosso cotidiano há alguns anos e auxiliam o processo de ensino em Biologia promovendo o acesso a informações, aumentando a interação entre discentes e docentes, permitindo a atualização dos conteúdos. Diante desses fatos, o professor de Biologia necessita ser estimulado a repensar sua ação pedagógica, visto que os termos biológicos são algumas vezes complexos e o uso desses recursos e ferramentas pode auxiliar o aluno no processo de uma aprendizagem mais elucidativa e menos abstrata. Mais especificamente, os conteúdos de Genética Molecular e Engenharia Genética podem se tornar um obstáculo no processo de aprendizado discente e na informação ao publico em geral, pois 1) estes conteúdos raramente são tratados no ensino fundamental e médio 2) estes conteúdos contém uma série de informações técnicas e metodológicas, o que pode dificultar o entendimento do público. Para além do ensino, ferramentas de meios digitais têm sido extensivamente utilizadas na divulgação científica de diversas áreas entre elas a Biologia. Como instrumento de divulgação científica, a oferta de uma ferramenta que contenha informação relevante e supervisionada por um especialista da área, utilizando uma linguagem acessível, fornece informação segura e confiável, permitindo a interação entre o especialista que a supervisiona e a alimenta regularmente, com o público, interessado na área em questão, em nosso caso, a Genética. Com o inesperado acontecimento da pandemia de covid-19 e sua chegada ao Brasil em março de 2020, foi necessária a migração imediata das aulas para o modo remoto. Assim, neste contexto pandêmico, iniciamos a construção de um website que tratasse dos assuntos relacionados à Genética para atender os discentes da Faculdade de Formação de Professores da UERJ. Entendemos que este mesmo espaço virtual poderá ser utilizado na divulgação científica para um público leigo, abordando temas relacionados à Genética.
PALAVRAS-CHAVE: Genética, Ensino remoto, divulgação científica.

USING WEBSITE WWW.GENETICAFACIL.ORG AS A DIGITAL TOOL IN TEACHING AND PROPAGATION OF THEMES RELATED TO GENETICS

ABSTRACT: Digital information technologies have been part of our daily lives for some years and help the teaching process in Biology by promoting access to information, increasing interaction between students and teachers, allowing the updating of content. Given these

facts, Biology teachers need to be encouraged to rethink their pedagogical action, since biological terms are sometimes complex and the use of these resources and tools can help the student in the process of a more enlightening and less abstract learning process. More specifically, Molecular Genetics and Genetic Engineering contents can become an obstacle in the student learning process and in information to the public in general, because 1) these contents are rarely dealt with in elementary and high school 2) these contents contain a series of technical and methodological information, which can make it difficult for the public to understand. In addition to teaching, digital media tools have been extensively used in scientific dissemination in several areas, including Biology. As an instrument of scientific dissemination, the offer of a tool that contains relevant information and supervised by a specialist in the area, using an accessible language, provides safe and reliable information, allowing interaction between the specialist who supervises and feeds it regularly, with the public, interested in the area in question, in our case, Genetics. With the unexpected event of the covid-19 pandemic and its arrival in Brazil in March 2020, it was necessary to immediately migrate classes to remote mode. Thus, in this pandemic context, we started the construction of a website that dealt with issues related to Genetics to serve FFP/UERJ students. We understand that this same virtual space can be used in scientific dissemination to a lay public, addressing topics related to Genetics.
KEYWORDS: Genetics, remote teaching, scientific propagation.

INTRODUÇÃO

O uso das tecnologias digitais no ensino

As tecnologias digitais de informação fazem parte de nosso cotidiano e do cotidiano escolar há alguns anos e auxiliam o processo de ensino em Biologia de forma significativa promovendo e ampliando o acesso às informações, aumentando o interesse e interação dos discentes e docentes nas aulas, permitindo a atualização dos conteúdos, entre outros. O avanço e a disseminação destas tecnologias são expressivos e o seu contínuo desenvolvimento ocorre em uma velocidade surpreendente, o que torna inevitável que fiquemos alheios a este processo. No contexto escolar, modificaram a realidade de instituições e, sobretudo os processos de ensino/aprendizagem. Essa nova realidade que a escola se depara estimula a reformulação da prática dos profissionais docentes, que constantemente buscam um aperfeiçoamento nestas tecnologias digitais a fim de que os alunos obtenham uma aprendizagem significativa (FERREIRA & BASILIO, 2006).

Assim, ensinar nos dias atuais exige diferentes competências que inclui conhecimento e diversos saberes, uma vez que os estudantes são “nativos digitais”, uma vez que dispõem de habilidades relacionadas à tecnologia, fluência digital e autonomia na realização das atividades (COSTA *et al.,* 2015). O computador, smartphones, tablets quando conectados a internet, promovem, portanto o desenvolvimento de atividades interdisciplinares nas escolas e estimulam uma postura científica sobre o conhecimento. No ensino de Biologia, a utilização das tecnologias digitais da Informação e comunicação facilita a compreensão

dos conteúdos abordados, quando discentes apresentam dificuldades na assimilação dos fenômenos físicos, químicos e biológicos. A utilização dos recursos tecnológicos permite aos alunos uma melhor compreensão dos conteúdos, possibilita um entendimento dos termos adotados nas ciências biológicas e favorece a obtenção de saberes. A Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional (LDBEN) (BRASIL, 1996), no artigo 32, inciso II, indica a compreensão destas tecnologias e suas implicações na sociedade, na formação básica, no Ensino Fundamental e no Ensino Médio, no artigo 35, inciso IV, determina "compreensão dos fundamentos científicos tecnológicos dos processos produtivos, relacionando a teoria com a prática, no ensino da cada disciplina".

Apesar de todo o avanço tecnológico, muitos professores ainda se pautam por aulas expositivas com uma participação muito pequena do aluno ou nenhuma. Devido a isso, o recurso mais usado ainda é o livro didático, que "tradicionalmente tem tido, no ensino de Biologia um papel de importância [...] no sentido de valorizar um ensino informativo e teórico" (KRASILCHIK, 2008, p.65). As tecnologias digitais podem auxiliar em práticas pedagógicas em que o aluno não seja tão passivo e se interesse mais pela aprendizagem. MORAN (1995, p.25) ressalta que "as tecnologias de comunicação não mudam necessariamente a relação pedagógica, não substituem o professor, mas modificam algumas de suas funções".

Vários trabalhos apontam para uma melhoria do ensino e aprendizagem com o uso das tecnologias digitais. No trabalho "Processos de Ensino e Aprendizagem da Biologia mediada por webquests: possíveis avanços conceituais" por HEERDT & BRANDT (2009) APUD SILVA & ROSA-SILVA (2014), os autores concluem que houve um processo de internalização onde conceitos científicos foram reelaborados pelos estudantes, e a maioria melhorou significativamente seus conhecimentos em relação aos conteúdos de célula. Em "Um estudo sobre o uso de suporte tecnológico no ensino de Biologia – Genética", LIOTTI & OLIVEIRA (2008) APUD SILVA & ROSA-SILVA (2014) concluem: "[...] diante da análise das avaliações e dos relatos apresentados, tanto pelos alunos como pelo professor regente sobre o material produzido, acreditamos que o uso das ferramentas tecnológicas pode contribuir para amenizar algumas dificuldades com conteúdos que envolvam aspectos microscópicos e de natureza complexa e abstrata, além de ser um auxílio para gerar questionamentos e discussões em sala de aula".

Diante desses fatos, o professor de Biologia necessita ser estimulado a repensar e a planejar sua ação pedagógica, visto que os termos biológicos são algumas vezes complexos e o uso desses recursos e ferramentas pode auxiliar o aluno no processo de uma aprendizagem mais significativa, elucidativa e menos abstrata. Estas ferramentas podem ser usadas e adaptadas para servir a fins educacionais e como tecnologia acessória; desenvolvidas de forma a possibilitar que a interatividade virtual se desenvolva de modo mais intenso, inclusive na produção de linguagens.

Alguns autores sugerem sites e aplicativos que contribuem para a inserção das tecnologias digitais nas aulas de Biologia. Para COSTA et al. (2012, p.69), A utilização das

tecnologias associada a metodologias que respondam as exigências e particularidades do ensino das Ciências promove um conjunto de competências científicas que se revelam em todos os domínios da aprendizagem (conhecimentos, capacidades e atitudes) (COSTA et al, 2012, p.69 APUD SILVA & ROSA-SILVA (2014).

MACEDO *et al.* (2013) APUD SILVA e ROSA_SILVA (2014) sugerem sites para Biologia, que podem ser úteis para a leitura e a preparação do professor, assim como algumas leituras e atividades para os alunos. São eles: ScienceBlogs Brasil (https://www.blogs.unicamp.br/sbbr/) - além de publicar artigos que discutem a ciência básica, os blogs científicos, (blog- versão simplificada da palavra weblog, sendo web – rede, log – diário, ou seja diário eletrônico ou digital) possuem uma característica interessante pois são pessoais, abrindo a possibilidade de os autores discutirem o dia a dia dos laboratórios e universidades, política e cultura, aproximando o público do aspecto humano de quem faz ciência. O Museu Virtual de Ciência e Tecnologia da Universidade de Brasília (http://www.museuvirtual.unb.br/index.htm) é uma ferramenta de divulgação científica, reunindo oito grandes seções com diversificadas amostras da produção científica da UnB: o Museu de Anatomia da Faculdade de Medicina; o Herbário do Departamento de Botânica; a Experimentoteca do Instituto de Física; o Laboratório de Pesquisas em Ensino de Química; o Observatório Sismológico; o Museu de Geociências; e as coleções do acervo zoológico. O museu abriga ainda as chamadas exposições virtuais, que têm caráter interativo e feição lúdica. O Biologia.seed.pr.gov.br (http://www.Biologia.seed.pr.gov.br/) - site direcionado a professores com animações, simulações, jogos, textos científicos atuais disponíveis ao uso do professor em sua prática pedagógica, que podem ser usados on-line ou feitos download e gravados em pendrive para utilização tanto no Datashow como na TV multimídia. O portal do MEC (portal.mec.gov.br) hospeda alguns sites que o MEC tem disponibilizado materiais e sugestões para o trabalho dos professores como TV Escola, Portal do professor, Domínio Público entre outros. Os exemplos são inúmeros.

O uso das ferramentas digitais na divulgação científica

Ferramentas de meios digitais têm sido extensivamente utilizadas na divulgação científica de diversas áreas entre elas a Biologia. Como instrumento de divulgação científica, visando atingir um público que se encontra alheio ao ambiente escolar, a oferta de uma ferramenta que contenha informação relevante e supervisionada por um especialista da área fornece informação segura e confiável, que pode ser eventualmente atualizada, além de permitir a interação entre o especialista que a supervisiona e a alimenta regularmente, com o público alvo, seja discente ou não discente, interessado na área em questão, em nosso caso, a Genética.

Uma das plataformas mais bem sucedidas é a Khan Academy (pt.khanacademy.org) A Khan Academy é uma organização sem fins lucrativos fundada por Salman Khan

Com a missão de proporcionar uma educação gratuita e de alta qualidade para todos, em qualquer lugar, oferece uma coleção grátis de vídeos de matemática, medicina e saúde, economia e finanças, física, química, biologia, ciência da computação, entre outras matérias. (https://pt.wikipedia.org/wiki/Khan_Academy, acesso em 25 de maio de 2021). No Brasil, os vídeos da plataforma foram inicialmente traduzidos para o português brasileiro pela Fundação Lemann, para servir como ferramenta de ensino em escolas brasileiras para ensinar matemática. No dia 18 de janeiro de 2014 foi lançado o site em modo beta.

Atualmente a Khan Academy possui escritório em São Paulo e um time brasileiro para administrar as operações locais e para a produção de conteúdo alinhados com a BNCC (Matemática, Ciências e Português). No Brasil, a plataforma possui mais de 3,8 milhões de usuários, entre alunos, pais e professores, além de contar com um projeto de parcerias com Secretarias de Educação. (https://pt.wikipedia.org/wiki/Khan_Academy, acesso em 25 de maio de 2021).

OBJETIVO GERAL

Disponibilizar o website "www.geneticafacil.org" para tratar de assuntos relacionados à área de Genética para discentes do curso de licenciatura em Ciências Biológicas da FFP/UERJ, discentes de cursos de Biologia e áreas afins, leigos e público em geral, discutindo e disponibilizando material didático relevante e atualizado, promovendo a divulgação científica tratando de temas atuais como a atual pandemia da covid-19.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Tornar os temas relacionados à Genética de fácil acesso para alunos e para o público em geral.

2) Disponibilizar material científico e didático para auxiliar as aulas e para a informação do público em geral.

3) Promover a discussão de temas específicos de Genética nas áreas disponíveis no website para tal fim como a área de "fórum de discussão" e a área de "chat".

4) Promover a divulgação científica de temas atuais e relevantes na Genética, tais como assuntos relacionados à atual pandemia de covid-19, abordando temas como vacinas, testes e variantes genéticas.

5) Convidar especialistas para participar das discussões de temas previamente selecionados através de entrevistas ou palestras.

6) Incentivar os discentes e público em geral a ser inscrever de forma totalmente gratuita no website

METODOLOGIA

O website disponibilizará a cada 15 dias um tema específico da Genética para discussão nos fóruns de debate. Poderá ser na forma de uma pergunta, na divulgação de uma biografia de um personagem relacionado à Genética, um vídeo do youtube ou uma imagem, provocando a participação dos membros (no momento o website conta com a inscrição de 50 membros). A divulgação será nas redes sociais do administrador e do Departamento de Ciências da Faculdade de formação de Professores. Avaliaremos a participação dos membros identificando os temas que obtiveram maior participação e interesse.

RESULTADOS

O Website www.geneticafacil.org

Com o inesperado acontecimento da pandemia de covid-19 no mundo e sua chegada ao Brasil em março de 2020, foi necessária a migração imediata das aulas que aconteciam de modo presencial para o modo remoto, imediatamente adotado por nossa Universidade, já na segunda semana do ano letivo de 2020. Assim milhares de professores e alunos, além da própria estrutura organizacional da Universidade se viram obrigados a encontrar meios e respostas com a máxima urgência a fim de garantir o acesso dos alunos às aulas e o acesso dos professores aos meios digitais disponíveis (tal como a plataforma AVA). Assim neste contexto pandêmico, iniciamos a construção de um website que tratasse dos assuntos relacionados à Genética e aos assuntos relacionados à disciplina que lecionávamos à época em ensino remoto (Fundamentos de Engenharia Genética). Este website com capacidade de 1 Gb (gigabyte) foi então construído e mantido com recursos próprios em julho de 2020, e nomeado "Genética Fácil" (www.geneticafacil.org) uma vez que a idéia inicial foi de 1) tornar os temas relacionados à Genética de fácil acesso para alunos e para o público em geral 2) disponibilizar material científico e didático para auxiliar as aulas e para a informação do público em geral.

Os conteúdos de Biologia, especialmente os conteúdos de Genética e mais especificamente ainda, os conteúdos de Genética Molecular e Engenharia Genética podem se tornar um complicador no processo de aprendizado entre alunos e na informação do publico em geral, pois 1) estes conteúdos raramente são tratados no ensino fundamental e médio 2) estes conteúdos contém uma série de informações técnicas e metodológicas, muitas vezes com a utilização de termos em língua estrangeira, o que pode dificultar o entendimento do público. A percepção de um especialista na área (leciono Genética Básica e Molecular há 25 anos e minha área de expertise é a Engenharia Genética e a Tecnologia do DNA Recombinante) pode identificar os problemas e tornar mais acessível a informação para o público, especialmente para o público leigo.

O website em sua descrição na página inicial: “se destina a alunos de Graduação em Biologia, profissionais da área e a qualquer pessoa que tenha interesse nesta área importante da Biologia. Neste site trataremos de assuntos relacionados à Genética Básica, Genética Molecular, Engenharia Genética, além de assuntos atuais como a atual pandemia mundial de covid-19. Genética é fácil, acredite! e bem vindo!”

O site possui outras ferramentas além de depósito e armazenagem de conteúdo científico, entre elas uma área de compartilhamento de arquivos (os arquivos em pdf ou ptt, preparados por mim, podem ser livremente baixados por qualquer pessoa a partir de uma inscrição totalmente gratuita e sem qualquer fim lucrativo). No momento atendemos pelo menos 100 alunos e possuímos 50 membros inscritos, porém o objetivo em curto prazo será atingirmos uma centena de membros. Além disso, há uma área para fórum de debates e uma área de chat, onde os membros podem se comunicar ou com o administrador. Foi ainda disponibilizado um email de contato do administrador para dirimir dúvidas ou para postagens de sugestões. No momento o website contém pelo menos oito arquivos de aulas realizadas on line na plataforma zoom, além de duas dezenas de arquivos com slides em pdf ou ppt de assuntos relacionados à Genética e Engenharia Genética.

Com a permanência da pandemia em nosso cotidiano, os assuntos relacionados à doença podem e serão tratados no site. Há uma palestra realizada por mim no ciclo de seminários remotos promovidos pelo Departamento de Ciências da Faculdade de Formação de Professores da UERJ, onde discorri (juntamente com a Professora Mônica Antônia Saad Ferreira, co-autora deste manuscrito) sobre os métodos de testagem de coronavirus e a importância do diagnóstico, que já se encontra depositada no site. As áreas do fórum e chat poderão ser utilizados por especialistas convidados para esclarecer dúvidas sobre a covid-19 e assuntos afins. Também poderemos utilizar o site para postar os artigos mais relevantes na área de testagem, vacinas e diagnóstico.

CONCLUSÕES

Pretendemos tornar o website um local de referência e relevância no ensino de Genética e na divulgação científica de temas relacionados à Genética, em especial, a atual pandemia de covid-19. Para tal será necessário aumentar o número de inscritos para a marca de uma centena de inscritos em curto prazo e de 200 inscritos no prazo de seis meses. A participação dos membros será de fundamental importância para o crescimento do website. Estes serão estimulados a participar através das redes sociais do administrador e do Departamento de Ciências e de demais Universidades. Pretendemos com o website dirimir dúvidas comuns nas áreas de Genética Básica, Genética Molecular, trabalhando pontos chaves na compreensão dos eventos biológicos, traduzindo esta Ciência tão complexa para uma linguagem acessível, mesmo para leigos e interessados na área, afinal, a “Genética é fácil”.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Educação. Secretaria de Educação Básica. *Diretrizes Curriculares Nacionais Gerais da Educação Básica*. Brasília: MEC, 2013.______. Lei ordinária nº. 9.394, de 20 de dezembro de 1996. *Estabelece asdiretrizes e bases da educação nacional*. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 23 dez.1996. p. 27833. 1996

COSTA, F. A.; RODRIGUEZ, C.; CRUZ, E.; FRADÃO, S. *Repensar as TIC naeducação.O professor como agente transformador*. In: Educação, Formação e Tecnologia. Lisboa: Santillana, 2012. Disponível em: <eft.educom.pt/index.php/eft/article/view/367/182>. Acesso em: 20 maio. 2014.

COSTA, Sandra Regina Santana; DUQUEVIZ, Barbara Cristina; PEDROZA, Regina Lúcia Sucupira. *Tecnologias Digitais como instrumentos mediadores da aprendizagem dos nativos digitais.* Psicol. Esc. Educ., Maringá , v. 19, n. 3, p. 603-610. 2015 .

FERREIRA, Daniel Paulo; BASÍLIO, Valéria Cristina. *O papel do professor frente às novas tecnologias estamos preparados?* Transversal - Revista Anual do Ieda, São Paulo, v. 4, n. 4, p.1-17, 2006.
KRASILCHIK, M. *Prática de Ensino de Biologia*. 4ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2008

KRASILCHIK, M. P. Prática de ensino de biologia. 4. ed. São Paulo: Edusp, 2008.

MACEDO, M.V., Nascimento, M. de S., Bento, L. *Educação em Ciências e as "novas" tecnologias.* Revista Práxis, ano V, nº 9, Junho de 2013.

MORAN, José Manuel. *Novas Tecnologias e o re-encantamento do mundo*. Tecnologia Educacional, Rio de Janeiro, v. 23, n. 126, p. 24-26, set/out.1995. Disponível em: http://www2.eca.usp.br/moran/?page_id=20>. Acesso em: 20 maio 2021.

SILVA E.P da & ROSA-SILVA P de O.. Os desafios da Escola Pública Paranaense na perspectiva do professor PDE. Cadernos PDE Versão online ISBN 978-85-8015-080-3. Volume 1, 2014.

SOBRE OS ORGANIZADORES

DANYELLE ANDRADE MOTA - Mestra e Doutora em Biotecnologia Industrial pela Universidade Tiradentes (UNIT), com internacionalização com o Doutorado Sanduíche no Instituto Superior de Agronomia pela Universidade de Lisboa. Especialista em Docência no Ensino de Ciências pela Faculdade Pio Décimo. Especialista em Neurociência pela Faculdade de Ciências da Bahia (FACIBA). Especialista em Recursos Hídricos e Meio Ambiente pela Universidade Federal de Sergipe (UFS). Graduada em Ciências Biológicas Licenciatura pela UFS. Durante a graduação desenvolveu pesquisas na área de Botânica (Taxonomia de Líquens), Microbiológica e Educacional. Durante o mestrado e doutorado desenvolveu trabalhos no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) atuando especialmente pesquisas focadas nas interações entre as áreas de biologia, bioquímica e engenharia química. Visando a melhoria do uso e transformação de recursos agroindustriais da região. Sendo assim, tem experiência na área de Biologia Celular, Microbiologia, Bioquímica, Química e Biocatálise com ênfase em imobilização de enzimas para aplicações em bioprocessos. Atualmente, é colaboradora no grupo de pesquisa do ITP, professora no Alternativo Curso e Colégio, professora na Uniplan Centro Universitário e professora voluntária na Universidade Federal de Sergipe.

CLÉCIO DANILO DIAS DA SILVA - Doutorando em Sistemática e Evolução pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Mestre em Ensino de Ciências Naturais e Matemática pela UFRN. Especialista em Ensino de Ciências Naturais e Matemática pelo Instituto Federal do Rio Grande do Norte (IFRN). Especialista em Educação Ambiental e Geografia do Semiárido pelo IFRN. Especialista em Gestão Ambiental pelo IFRN. Graduado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Facex (UNIFACEX). Graduado em Pedagogia pelo Centro Universitário Internacional (UNINTER). Tem vasta experiência em Zoologia de Invertebrados, Ecologia aplicada; Educação em Ciências e Educação Ambiental. Áreas de interesse: Fauna Edáfica; Taxonomia e Ecologia de Collembola; Ensino de Biodiversidade e Educação para Sustentabilidade.

ÍNDICE REMISSIVO

Q

S

Z



PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora
Ano 2022



PRODUÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Atena Editora

Ano 2022